

東邦大学審査学位論文（博士）

博士学位論文

乳がん治療を目指した
選択的な受容体型転写因子調節薬の研究

2020 年度

東邦大学大学院 薬学研究科
医療薬学専攻 分子病態解析学講座
公衆衛生学教室

齋藤 菜緒

目次

略語.....	3-4
緒言.....	5-9
第1章.....	10-31
選択的エストロゲン受容体 α 部分アゴニスト 10-dehydroxyglycyuralin E (T9) の同定	
1-1: 序論	
1-2: 方法	
1-2-1. 使用化合物	
1-2-2. 化合物の合成手順と分光データ (supplemental data)	
1-2-3. 細胞培養	
1-2-4. プラスミド構築	
1-2-5. <i>Gaussia</i> -luciferase reporter assay (Mammalian one-hybrid assay)	
1-2-6. ERE-luciferase reporter assay	
1-2-7. MTS assay	
1-2-8. RNA 抽出	
1-2-9. 逆転写 (RT) 反応	
1-2-10. リアルタイム PCR	
1-2-11. SDS-PAGE/ウエスタンブロット	
1-2-12. ドッキングシミュレーション (supplemental data)	
1-2-13. 統計解析	
1-3: 結果	
1-3-1. ER α 部分アゴニスト作用の探索	
1-3-2. ER α 陽性乳がんのエストロゲン依存的細胞増殖抑制作用のスクリーニング	
1-3-3. T9 の化学合成 (supplemental data)	
1-3-4. ドッキングシミュレーション	
1-4: 考察	

第 2 章.....	32-52
芳香族炭化水素受容体 (AHR) による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制	
2-1: 序論	
2-2: 方法	
2-2-1. 使用化合物	
2-2-2. AHR-ノックアウト (AHR-KO) 細胞の樹立	
2-2-3. 細胞培養	
2-2-4. プラスミド構築	
2-2-5. SDS-PAGE/ ウェスタンブロット	
2-2-6. Mammosphere formation assay	
2-2-7. MTS assay	
2-2-8. RNA 抽出	
2-2-9. 逆転写 (RT) 反応	
2-2-10. リアルタイム PCR	
2-3: 結果	
2-3-1. AHR アゴニストによる細胞毒性の評価	
2-3-2. AHR アゴニストによる腫瘍様塊形成への影響	
2-3-3. AHR アゴニストによる AHR を介した転写活性化作用の比較	
2-4: 考察	
総括.....	52-53
謝辞.....	54
参考文献.....	55-63
Supplemental data.	64-94

略語

3MC; 3-methylcholanthrene

AC; acidic subdomain

AHR; aryl hydrocarbon receptor

ARNT; aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

BaP; benzo[*a*]pyrene

bHLH; basic helix-loop-helix

β NF; β -naphthoflavone

CYP; cytochrome P450

CRISPR/Cas; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein

DBD; DNA binding domain

DMBA; 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO; dimethyl sulfoxide

E2; 17 β -estradiol

ER; estrogen receptor

ERE; ER response element

FBS; fetal bovine serum

FDA; Food and Drug Administration

FICZ; 6,12-diformylindolo[3,2*b*]carbazole

GR; glucocorticoid receptor

GREB1; growth regulation by estrogen in breast cancer 1

HRT; hormone replacement therapy

HRP; horseradish peroxidase

HSP90; heat shock protein 90

I3C; indole-3-carbinol

IL; interleukin

KO; knockout

LBD; ligand binding domain

LBP; ligand binding pocket
Luc; luciferase
NES; nuclear export signal
NLS; nuclear localization signal
NR; nuclear receptor
NTD; N-terminal domain
PAS; PER-ARNT-SIM
PBS; phosphate buffered saline
PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor
PR; phenol red
PST; proline/serine/threonine rich subdomain
Q; glutamine rich subdomain
SDS; sodium dodecyl sulfate
SERM; selective estrogen receptor modulator
SNRM; selective nuclear receptor modulator
TAD; transactivation domain
TCDD; 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin
TGH; tris-glycine-HCl
TGS; tris-glycine-SDS
XAP2; hepatitis B virus X-associated protein 2
XRE; xenobiotic response element

緒言

遺伝子発現制御の中心を担う転写因子は、特異的 DNA 配列に結合し、転写共役因子複合体を形成して標的遺伝子の転写を制御する。受容体型転写因子は、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンのような低分子化合物（リガンド）によって活性制御を受ける転写因子である。リガンドの結合により活性化した受容体型転写因子は、細胞質から核内へ移行し、標的遺伝子のプロモーターに存在する応答配列に結合した後、その標的遺伝子の転写を活性化する (Fig. 1)。受容体型転写因子として、核内受容体 (nuclear receptor ; NR) スーパーファミリーや芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor ; AHR) が知られており、機能の異なる複数の標的遺伝子の転写制御を担うことで様々な生理機能調節に関与している。

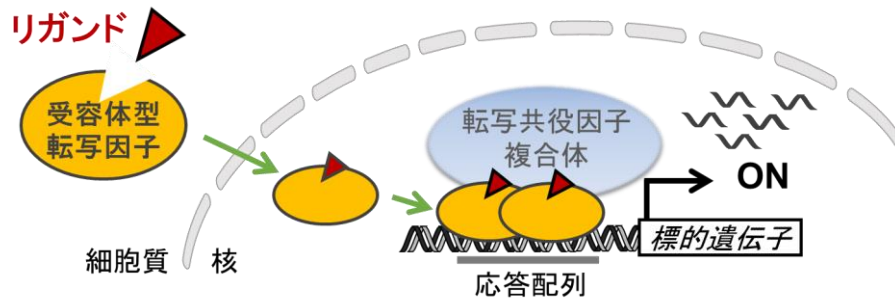


Fig. 1. 受容体型転写因子による遺伝子発現制御機構

核内受容体スーパーファミリー [1,2]は、N 末端側からリガンド非依存的な転写活性化領域 (AF-1 領域) を含む N-terminal domain (NTD)、DNA-binding domain (DBD)、hinge 領域 (H)、リガンド依存的な転写活性化領域 (AF-2 領域) やリガンド結合ポケット (ligand binding pocket ; LBP) を備えた C 末端 ligand binding domain (LBD) を有する分子構造をもつ (Fig. 2、[3])。各機能ドメインは、タンパク質の安定化や転写調節のため、複数のタンパク質との相互作用に関与している。また、核内で機能するタンパク質と同様に、核内受容体は核移行シグナル (nuclear localization signal ; NLS) や核外輸送シグナル (nuclear export signal ; NES) を有する。核内受容体はホモまたはヘテロダイマーを形成し、不完全なパリンδροーム配列または 2 つのヘキサヌクレオチド-half サイトの直列、反転または反転リピートして構成された特徴的な DNA 応答配列に結合する [4-7]。核内受容体は、既知の受容体との配列類似性により多数の核内受容体が同定されているが、内因性リガンドが同定されていない孤児受容体 (orphan receptor) を含み、ヒトにおいては 48 種類の核内受容体が報告されている。

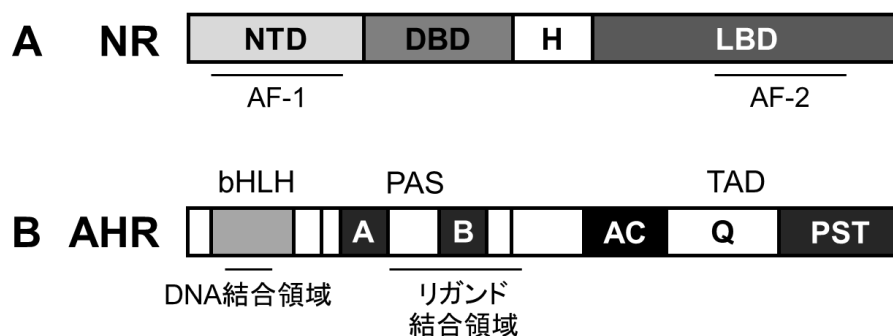


Fig. 2. 核内受容体および AHR の分子構造

(A)核内受容体(NR)の分子構造概略図。NTD: N-terminal domain、DBD: DNA-binding domain、H: hinge 領域、LBD: ligand-binding domain、AF-1: activation function 1、AF-2: activation function 2。

(B)AHR の分子構造概略図。bHLH: basic helix-loop-helix、PAS: PER-ARNT-SIM、TAD: transactivation domain、AC: acidic subdomain、Q: glutamine rich subdomain、PST: proline-serine-threonine rich subdomain。

AHR は、環境汚染の原因の一つであるダイオキシン類の結合タンパク質として同定された受容体型転写因子であり、核内受容体とは構造が異なる basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM (bHLH/PAS) ファミリーに属する (Fig. 2、[8])。N 末端に、塩基性アミノ酸に富んだ bHLH 構造をもち、DNA 結合領域、NLS、NES を有する。続いて、リガンド結合およびヘテロダイマー結合領域が位置し、C 末端側には、酸性サブドメイン (acidic subdomain ; AC)、グルタミンリッチドメイン (glutamine rich subdomain ; Q)、プロリン-セリン-スレオニンリッチサブドメイン (proline-serine-threonine rich subdomain ; PST) の 3 つのサブドメインから構成される転写活性化領域 (transactivation domain ; TAD) を有した分子構造をとっている [9,10]。

AHR は通常、分子シャペロンである heat shock protein 90 (Hsp90)、p23、hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2) と複合体を形成して細胞質に局在しており、リガンド結合によって AHR は核内へ移行し、核内において Hsp90 複合体から解離して AHR 核輸送単体 (AHR nuclear translocator ; ARNT) とヘテロダイマーを形成し、AHR/ARNT 複合体は標的遺伝子のプロモーター領域にある異物応答配列 (xenobiotic response element ; XRE) に結合して転写の活性化を惹起する [11-13] (Fig. 3)。AHR の代表的な標的遺伝子としては、薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 1A1 や CYP1B1 などが知られ [14,15]、これら酵素誘導により異物代謝を促進する異物受容体の一つとして生理的機能を示す。

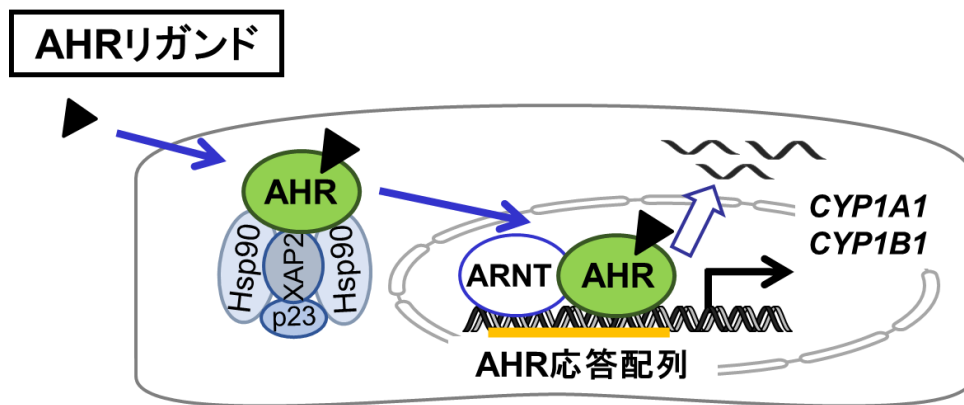


Fig. 3. AHR の転写活性化機構

受容体型転写因子の標的遺伝子は、生理作用だけではなく様々な疾病に関与するものも多く、アメリカ食品医薬品局 (FDA) が認可している医薬品の約 16% が核内受容体スーパーファミリーを治療標的としたものである (2016 年) [16]。例えば、デキサメタゾンやプレドニゾロンは、グルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor ; GR) を標的としたステロイド性抗炎症薬である。また、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha ; PPAR α) を標的としたフィブラート系薬剤脂質異常症治療薬のベザフィブラートやフェノフィブラート、PPAR γ を標的としたチアゾリジン系のインスリン抵抗性改善薬のピオグリダゾン、ロシグリダゾンなどが挙げられる。これらのように低分子化合物であるリガンドによって、活性を制御できる核内受容体や AHR のような受容体型転写因子の新規リガンドの同定やその機能を利用した新たな治療戦略の提案は重要な研究対象とされている。

核内受容体には、組織特異的に作用を発揮するリガンドが存在する。それらは、選択的核内受容体調節薬 (selective nuclear receptor modulator ; SNRM) と呼ばれ、ある組織ではアゴニストとして作用し、また異なる組織においてはアンタゴニスト作用を示す特徴を持つ。その代表例が、エストロゲン受容体 (estrogen receptor ; ER) [17,18] を標的とした選択的エストロゲン受容体調節薬 (selective estrogen receptor modulator ; SERM) のタモキシフェンである (Fig. 4)。タモキシフェンは、乳がん組織においてアンタゴニスト作用 (抗エストロゲン作用) を示すが、子宮体や子宮内膜においてはアゴニストとして作用する。このように、SNRM は一つのリガンドで核内受容体の機能発現を組織選択的に制御することが可能な核内受容体リガンドである。SNRM の組織選択性が認められる要因として、転写共役因子の発現や転写複合体形成が組織により異なるためと推察されているが [19-21]、完全には明らかにされていない。これまでも SNRM の特徴を示

す化学物質が複数報告されているが、SNRM による選択的な作用発現の分子基盤は未解明まま臨床治療薬として使用されているケースもある。

● タモキシフェン
選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)

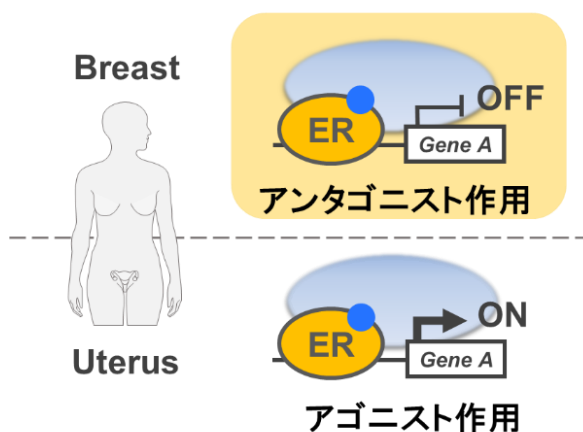


Fig. 4. 選択的エストロゲン受容体調節薬の組織選択性

その一方で当教室では、組織選択性に加え、同一組織においても遺伝子選択的に発現を調節可能な核内受容体の選択的機能調節薬を複数見出している。東邦大学薬学部薬化学教室との共同研究により見出された YK11 は、核内受容体であるアンドロゲン受容体 (androgen receptor ; AR) に結合する合成化合物であり、AR のフルアゴニストによって誘導される AR の標的遺伝子のうち、その一部の遺伝子では誘導がかからないことを報告している [22]。また、当教室で新規 PPAR β/δ アゴニストとして同定された天然化合物 Picrasidine N は、PPAR の標的遺伝子発現において、既存の合成 PPAR β/δ アゴニストとは異なる遺伝子を誘導することを報告している [23]。これらのように、同一細胞内において、発現誘導する遺伝子パターンがフルアゴニストや他のアゴニストと異なる核内受容体リガンドが存在することを報告している。

核内受容体は典型的なアゴニストによって活性化され、様々な機能を発現するが、状況によってはそれらが毒性的または不利益な機能となって発現してしまうことがある。このような問題の改善策として、一つのリガンドで、核内受容体の各機能を選択して発現することが可能な核内受容体リガンド(選択的機能調節薬)を用いることができれば、意図的に受容体型転写因子の機能をコントロールすることができ、さらに様々な疾患における治療薬としての応用が可能であると考えられる。そこで本研究では乳がんに着目

し、「乳がんにおける選択的機能調節薬を同定して、受容体型転写因子を標的とした新たな創薬基盤を確立する」ことを研究目的とした。第 1 章では、エストロゲン受容体 ER α を標的とした乳がんにおける選択的機能調節薬候補となる化合物の探索を実施した。また第 2 章では、核内受容体とは構造が異なる受容体型転写因子 AHR においても選択的機能調節薬の存在を仮定し、乳がんにおける治療薬としての可能性を検討した。

第 1 章

選択的エストロゲン受容体 (ER) α 部分アゴニスト
10-dehydroxyglycyuralin E (**T9**) の同定

1-1. 序論

エストロゲン受容体 (estrogen receptor ; ER) は、核内受容体スーパーファミリーに属する[17,18]。17 β -estradiol (E2) などのエストロゲンは、乳腺や子宮などの生殖器官系、骨形成や心血管系、中枢神経系などにおいて様々な生理的機能を担っており、これらの幅広い生理作用は、エストロゲンの標的臓器に存在する ER を介して発揮される。ER は主に核内に局在しており、エストロゲンが結合することによって ER は二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター上に存在する ER 応答配列 (ER response element ; ERE) に結合して標的遺伝子の転写を活性化する (Fig. 5)。ER には、ER α (NR3A1) と ER β (NR3A3) の2つの異なるサブタイプに分類され、ともに E2 と結合して活性制御を受けるが、配列相同性や臓器/組織における発現、標的遺伝子の機能にサブタイプ間で大きな違いがあるとされている [24-26]。

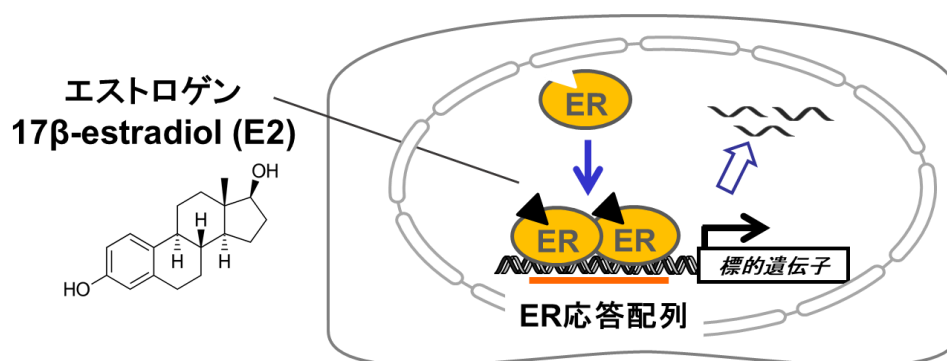


Fig. 5. ER の転写活性化機構

ホルモン補充療法 (hormone replacement therapy ; HRT) は、更年期症状 (ほてりなど) の緩和や骨粗鬆症予防などを目的として、エストロゲンレベルの調節に用いられる [27]。対照的に、抗エストロゲン薬は、エストロゲン依存性乳がん [28]や閉経後子宮内膜症 [29]、子宮平滑筋腫 [30]などのエストロゲン関連疾患の治療薬として使用されている。また、選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) [19,31]は、エストロゲン標的組織の ER α に対して選択的に作用を示すことが期待される化合物であり、タモキシフェン [32,33]やラロキシフェン [34,35]は閉経後 ER 陽性乳がん、バゼドキシフェン [36,37]は閉経後骨粗鬆症の治療および予防に用いられている。しかしながら、いずれも長期的な SERM の使用は、脳卒中や深部静脈血栓塞栓症 [38]、薬剤耐性 [39]など深刻

な副作用のリスクを高める可能性があることも報告されている。

乳がんとは、乳管や小葉上皮から発生する悪性腫瘍であり、外科手術や薬物療法、放射線療法といったこれらの集学的治療により、治療成績は年ごとに向上してきている。その一方で、乳がん罹患数は増加し続けており、わが国における女性の部位別がん罹患率が最も高く、女性のがんによる死亡の主な原因の一つとなっており、乳がんの新しい治療法が望まれている。乳がん全体の約6~7割はER α 陽性であり、エストロゲン依存的ながん細胞の増殖が認められる。閉経前のER α 陽性乳がんにおける術後療法として用いられているタモキシフェンは、乳がん組織において抗エストロゲン作用（アンタゴニスト作用）を示し、エストロゲン依存的乳がん細胞の増殖を抑制することから、乳がん治療薬として使用されている [19]。しかしながら、タモキシフェンは、乳房組織においてがん細胞増殖だけでなく、その他機能に対してもアンタゴニスト作用を示してしまう。そこで同一組織内において、ER α の有益な機能のみを発現するER α リガンドであれば、乳がん治療における新たな代替薬となり得ると考え、本章ではER α の有益な機能を選択的に発現可能なタモキシフェンの新たな代替乳がん治療薬となり得るシード化合物を探索することを目的とし、新たなER α リガンドの探索を試みた。SNRMの一つである選択的アンドロゲン受容体調節薬は、フルアゴニストに対して50-80%の転写活性化作用を示すことが報告されている (reporter assayによる部分アゴニスト活性) [40]。したがって、本研究では、ER α の有益な機能を発揮 (ON) する能力を保持する部分アゴニストを探索することとし、また、ER α 陽性乳がんの治療効果として、エストロゲン依存的ながん細胞増殖抑制作用とあわせてスクリーニングを行い、目的化合物の探索を行った。

1-2. 方法

1-2-1. 使用化合物

表 1.

化合物名	略名	メーカー
17 β -estradiol	E2	Wako
Dimethyl Sulfoxide	DMSO	Wako

東邦大学薬学部生薬学教室より提供頂いた化合物ライブラリーの化学構造式 (299 種) を supplementary data (表 1S) に示した。化合物 mt8 および mt9 は、混合した mt8/9 (5 μ M) を用いたため、スクリーニングには計 298 種の化合物を使用した。

1-2-2. 化合物の合成手順と分光データ

Supplementary data に記載

1-2-3. 細胞培養

ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 を、10% charcoal-stripped ウシ胎児血清 (csFBS; Gibco) と 100 U/mL penicillin および 100 μ g/mL streptomycin (Pen Strep; Gibco) を含む phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose (DMEM/- ; Wako) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクより購入した。MCF-7 は、5%のウシ胎児血清 (FBS; Gibco)、100 U/mL penicillin および 100 μ g/mL streptomycin (Pen Strep; Gibco) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose (DMEM; Wako) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

1-2-4. プラスミド構築

ヒト ER α および ER β をコードする cDNA を PCR で増幅し、pcDNA5 vector (Thermo Fisher Scientific) に導入して発現ベクターを作製した。

ER α Fw: 5'-GACGGCGATCGCCATGACCATGACCCTCCACACCAAAGC-3'

Rev: 5'-ACGTGTTTAAACCTCAGACCGTGGCAGGGAAACC-3'

ER β Fw: 5'-GCGGGATCCATGGATATAAAAACTCACC-3'

Rev: 5'-GCGCTCGAGCTACGCATTTCCCCTCATCC-3'

また、酵母由来の転写因子 GAL4 の DBD および ER α の LBD をコードする cDNA を pcDNA5 ベクターに導入しクローニングした (GAL4/DBD-ER α /LBD)。GAL4 応答配列 (GALRE) / TATA ボックスを pMCS-Gussia Luc vector (Thermo Fisher Scientific) に導入し、GALRE 駆動性の *Gussia-luciferase* (*Gussia GALRE-luc.*) reporter vector を作製した。また、コンセンサスな ER 応答配列 (ERE) の 3 つのタンデムリピートを、TATA ボックスを含む DNA 配列をアニーリングし、pGL4.24vector (Promega) のマルチクローニングサイトに組み込んだ ERE 駆動性の luciferase (ERE-luc.) reporter vector を作製した。DNA 配列を以下に示す (下線は ERE 配列を示す) [41]。

5'-

CGAGCTTAGGTCACTGTGACCTGAGCTTAGGTCACTGTGACCTGAGCTTAGGTCACTGTGACCT -3'

5'-

AGGTCACAGTGACCTAAGCTCAGGTCACAGTGACCTAAGCTCAGGTCACAGTGACCTAAGCTCGAGCT-3'

1-2-5. *Gussia-luciferase* reporter assay (Mammalian one-hybrid assay)

HEK293 細胞を 5% csFBS を含む DMEM/- で 24 時間培養した。1 well あたり 12.5 μ L の DMEM/PR- に GAL4 /DBD-ER α / LBD expression vector (0.025 μ g) および GAL-RE *Gussia-luc.* reporter vector (0.05 μ g)、トランスフェクション試薬として PEI Max reagent (Polysciences Inc.) を総 DNA 量の 5 倍量 (0.375 μ L) を加え、15 分間インキュベートした。その後、5% csFBS を含む DMEM/- で調整した HEK293 細胞懸濁液と混ぜ合わせ、96 well プレートに播種した。翌日、細胞に溶媒 (0.1% DMSO)、被験化合物 (10 μ M) または 17- β estradiol (E2, 10 nM) を処置し、さらに 24 時間後、培養上清を採取した。

Gussia-luciferase 活性は、Pierce™ *Gussia Luciferase Flash Assay Kits* (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。測定を行う直前に *Gussia Flash Assay Buffer* 1 mL に 100 \times Coelenterazine を 10 μ L 加えて、assay 溶液を調製し、チューブを数回転倒混和してよく混合した。測定チューブに、15 μ L の培養上清を採取し、assay 溶液を 5 μ L を加えてピペッティングにより混和させ、迅速に *Gussia luciferase* 活性を測定した。装置は Smart Light Lumino meter (Molecular Light Technology) を用いた。

1-2-6. ERE-luciferase reporter assay

HEK293 細胞を 5% csFBS を含む DMEM/- で 24 時間培養した。1 well あたり 12.5 μ L の DMEM/PR- に ERE-luc. reporter vector (0.05 μ g)、pGL4.74[hRluc/TK] (0.01 μ g)、トランスフェクション試薬として PEI Max reagent を総 DNA 量の 5 倍量 (0.3 μ L) を加え、15 分間インキュベートした。その後、MCF-7 細胞と混ぜ合わせ、96 well プレートに播種した。翌日、細胞に溶媒 (0.1% DMSO)、被験化合物を処理し、24 時間後に培地を除去した後、1 \times PLB (25 μ L) で細胞を溶解した。

Luciferase 活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。細胞溶解液は、MilliQ 水で 5 倍希釈した Passive Lysis Buffer (1 \times PLB) を用いた。Luciferase Assay Substrate 1 vial に Luciferase Assay Buffer II を加え、LAB 溶液とし、Stop & Glo Buffer に Stop & Glo Substrate (SG) を 100 分の 1 の量を加え、SG+溶液とし培地を除去したプレートに 1 \times PLB (25 μ L) を添加し、20 分間振とうし、細胞を溶解した。その細胞溶解液 5 μ L を測定チューブに移し、15 μ L の LAB を加えてピペティングし、*firefly* luciferase 活性を測定した。その後、15 μ L の SG+を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、*renilla* luciferase 活性を測定した。この *renilla* luciferase 活性を内部標準として補正を行った。装置は Smart Light Lumino meter (Molecular Light Technology) を用いた。

1-2-7. MTS assay

MCF-7 細胞を 5% csFBS を含む DMEM/- で 24 時間培養した。細胞を 1×10^4 cells/mL の濃度で 96 well plate に播種し、翌日に調製した薬剤および溶媒 (0.1% DMSO) を最終濃度になるように処置した。72 時間後、1 well あたり 20 μ L の CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (テトラゾリウム化合物) に等量の 5% csFBS 含有 DMEM/- を加えて調製した試液を、薬剤処置した細胞に 1 well あたり 40 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂ 下で 10 分間インキュベートした後、波長 490 nm でそれぞれ測定した。

1-2-8. RNA 抽出

培養プレートの培地を除去し、ISOGEN II (NIPPON GENE) を添加 (24 well plate : 125 μ L) した後、5 分間振とうした。溶液を 1.5 mL チューブに回収し、MilliQ 水を添加 (24 well plate : 50 μ L) し、混和した後、5 分間静置した。15000 rpm で 15 分間遠心し、上清を回収 (24 well plate : 125 μ L) した後、そこに等量の 70% エタノールを添加し、転倒混和した。15000 rpm で 10 分間遠心し、RNA を沈殿させた。上清を除去し、500 μ L の

70% エタノールを添加し、15000 rpm で 5 分間遠心した後、上清を除去した。この工程を 3 回繰り返した後、70% エタノールを完全に除去し、RNA を風乾させた。RNA を Nuclease free water (NFW) 15 μ L で溶解し、RNA 溶液とした。以上で得られた RNA 溶液の濃度を 260 nm の吸光度により定量し、NFW を用いて 2 μ g/10 μ L になるように調整した。

1-2-9. 逆転写 (RT) 反応

ReverTra-Ace qPCR-RT Mix (TOYOBO) を使用する本数 \times 0.5 μ L と等量の NFW を混合し、1.5 mL チューブに 1 μ L ずつ分注した後、2 μ L の調整した RNA 溶液をそれぞれ加え、混合した。37°C で 30 分間インキュベートした後、98°C で 5 分間インキュベート後氷冷し、TE (pH 8.0) バッファ (NIPPON GENE) 22.5 μ L を添加し、cDNA サンプルとした。

1-2-10. リアルタイム PCR

1 サンプルあたり KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を 12.5 μ L、50 \times ROX reference dye を 0.05 μ L、Forward および Reverse プライマーをそれぞれ 0.5 μ L、MilliQ 水を 12.5 μ L を混和し、マスターミックスとした。検量線を得るために、サンプルを混和した検量線サンプルを作製し、1 倍、5 倍、25 倍、125 倍となるように TE (pH 8.0) バッファで希釈した。0.6 mL チューブにマスターミックスを 24 μ L ずつ分注した後、1 μ L の cDNA サンプルを加え混和した。この混和液を 10 μ L ずつ、96 well PCR プレート (Sorenson BioScience, Inc) の上下 2 つの well に分注し、7500 Fast System (Applied Biosystems) で PCR を行った。反応条件は、最初に 95°C 5 分間で初期変性を行った後、95°C 10 秒 \rightarrow 55°C 20 秒 \rightarrow 72°C 30 秒で計 50 サイクル行った。データは、Applied Biosystems 7500 Fast System SDS ソフトウェアを用いて分析した。使用したプライマーを下記の表 2 に示す。内部標準として *β -actin* を用いて補正をおこなった。

表 2.

Gene	Forward	Reverse	bp
<i>GREB1</i>	CACATCTATCCTAGACATTTA	CGCGGACTTTTTTTCTTAGGA	120
<i>β-actin</i>	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	88

1-2-11. SDS-PAGE/ ウェスタンブロット

培養した細胞から培養液をアスピレーターで除去した後、SDS サンプルバッファーを加えて細胞を溶解し、1.5 mL チューブに移した。ピペッティングにより DNA を切断した後、98°C で 5 分間熱変性を行い、4°C で冷却した。Ionic Detergent Compatibility (Thermo Fisher Science) を加えた Pierce® 660 nm Protein assay Reagent (Thermo Fisher Science) 150 μ L に、検量線用 BSA (1 μ g/ μ L) を 0、1、2、5 μ L、サンプルをそれぞれ 2 μ L ずつ加えた。攪拌し室温で 5 分間静置した後、660 nm で吸光度を測定し、検量線を作製してサンプル濃度を算出した。

7.5% の分離ゲルおよび 4.5% の濃縮ゲルを作製 (表 3) し、泳動バッファー (1×TGS) を電気泳動装置 (ATTO) に入れ、30 mA の電流で 10 分間のプレランニングを行った。その後、サンプルをゲルにアプライし、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。転写バッファーにゲルを浸して 10 分間振とうさせた。メタノールで親水処理した後、転写バッファーで平衡化しておいた Immobilon-P メンブレン (MERCK Millipore) にゲルをのせ、200 mA で 30 分間ブロッティングした。メンブレンを Ez Block chemi (ATTO) に浸し、30 分間室温で振とうし、ブロッキングした。その後、PBS-T で 1 次抗体を希釈した抗体希釈液で 1 時間以上もしくは 4°C で一晩 1 次抗体反応を行った (表 5)。その後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 2 回行い、PBS-T で 2 次抗体 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technologies) を 4000 倍希釈した抗体希釈液で 1 時間以上もしくは 4°C で一晩 2 次抗体反応を行った。メンブレンは PBS-T で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、Luminata Crescendo Western HRP Substrate (MERCK Millipore) を均一に滴下し、WSE-6100H LuminoGraph I (ATTO) を用いて撮影した後、画像解析ソフトウェア Image J (National Institutes of Health) によってバンドの強度を解析した。以下に SDS PAGE に用いたゲルおよび試薬の組成、使用した 1 次抗体と免疫原、希釈倍率を示す。

表 3.

試薬	7.5% 分離ゲル (mL)	4.5% 濃縮ゲル (mL)
MilliQ 水	2.8	1.64
40% アクリルアミド/ビス混合液 (nacalai tesque)	0.94	0.281
EzGel Ace (ATTO)	1.25	0.3
10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS, Wako)	0.1	0.05

N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED, Wako)	0.005	0.005
---	-------	-------

表 4.

試薬	組成
SDS サンプルバッファー	125 mM Tris-HCl pH6.8、4% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、20% Glycerol、0.01% Bromophenol blue、10% Dithiothreitol
10×Tris-Glycine-SDS (TGS)	250 mM Tris、1.92 M Glycine、1% SDS
1×TGS (泳動バッファー)	10×TGS を蒸留水で 10 倍希釈して調整
10×Tris-Glycine-HCl (TGH)	250 mM Tris、1.92 M Glycine、HCl で pH8.4 に調整
転写バッファー	10×TGH 50 mL、MeOH 75 mL、蒸留水で 500 mL に調整
10×Phosphate Buffered Saline (PBS)	1.37 M NaCl、26.8 mM KCl、84.4 mM Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O、14.7 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	10×PBS を蒸留水で 10 倍希釈し、0.1% Tween-20 (MP Biomedicals) を加えて調整

表 5.

1 次抗体	希釈倍率	メーカー
AHR (D5S6H) Rabbit mAb	2,000	Cell Signaling Technology
Anti- α -Tubulin HRP DirectT	10,000	MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD (MBL)

1-2-12. ドッキングシュミレーション

Supplementary data に記載

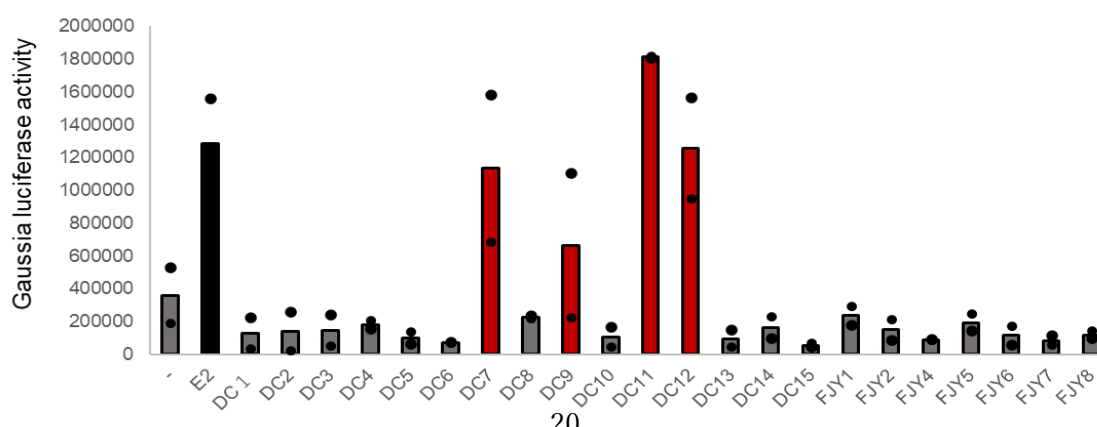
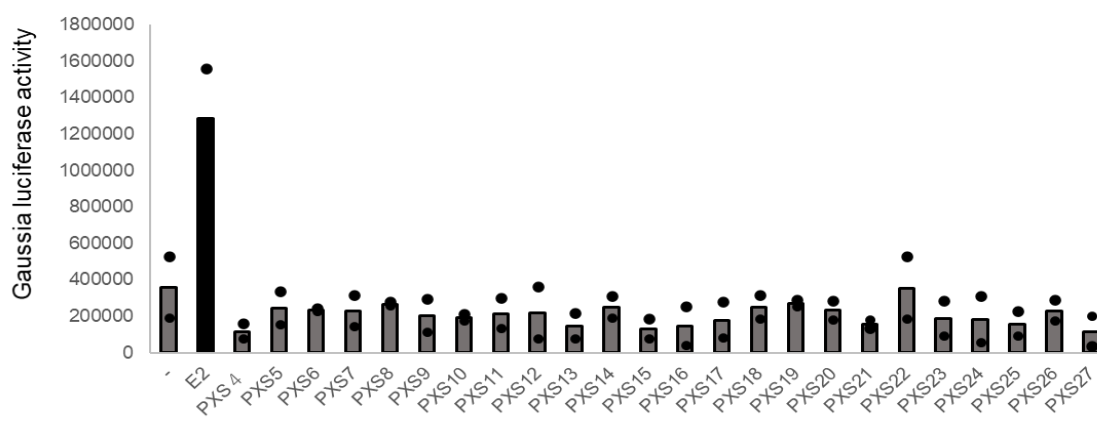
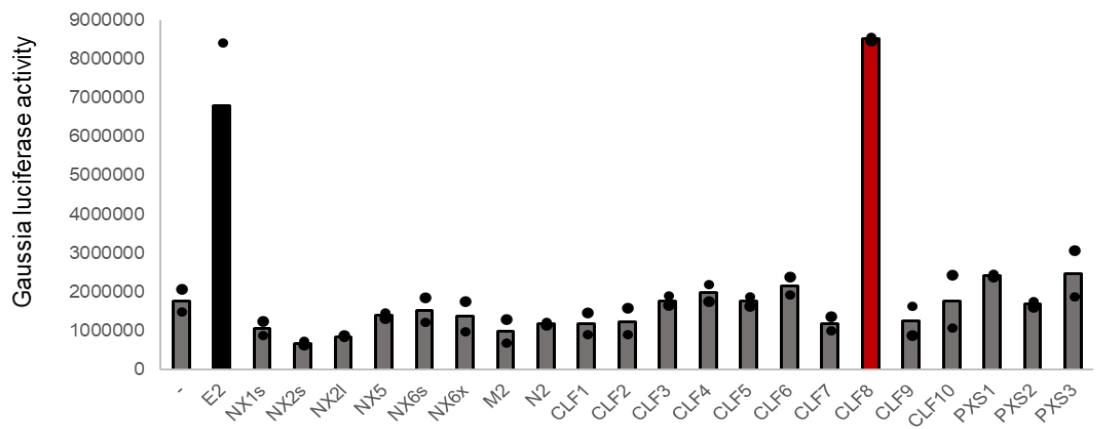
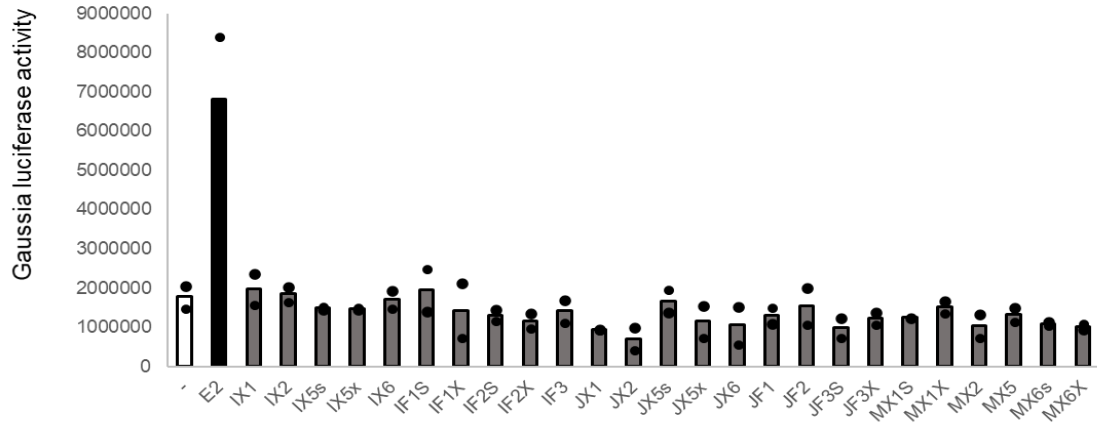
1-2-13. 統計解析

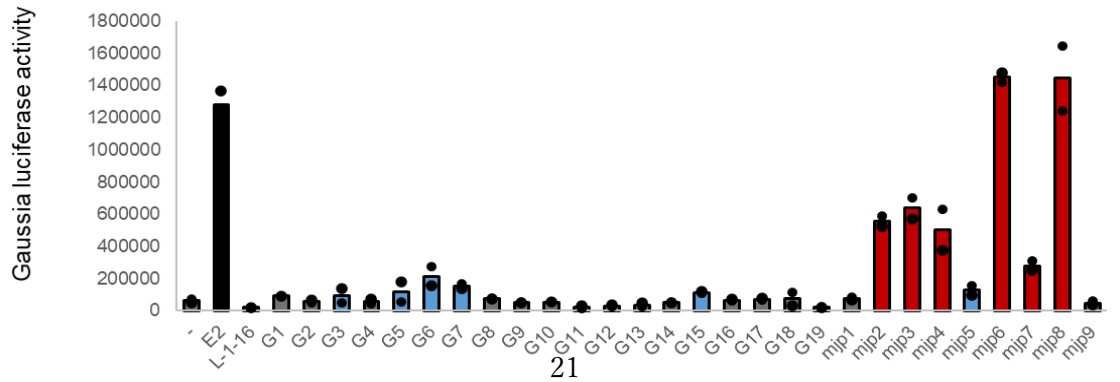
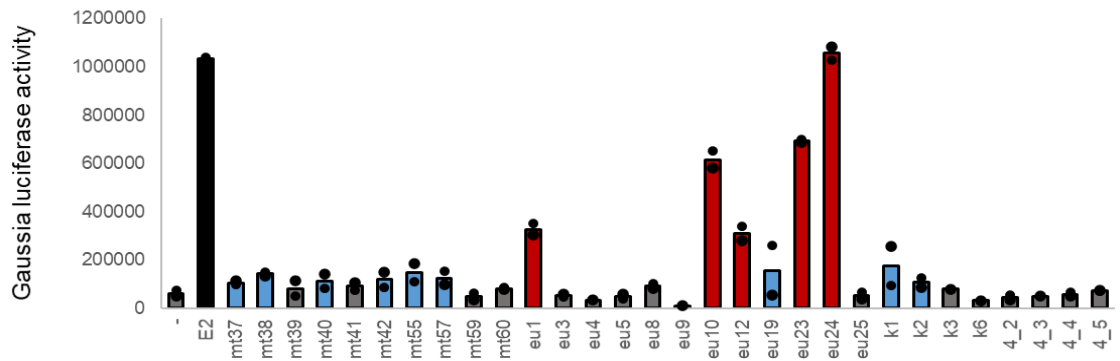
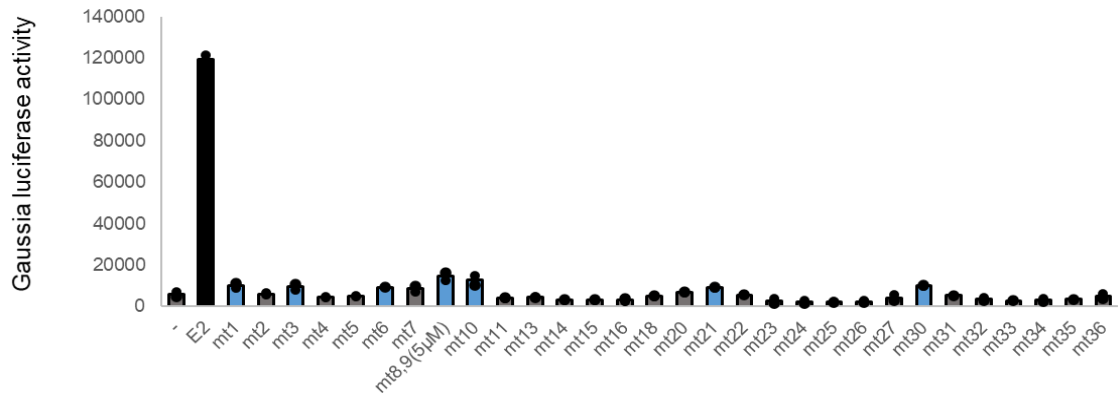
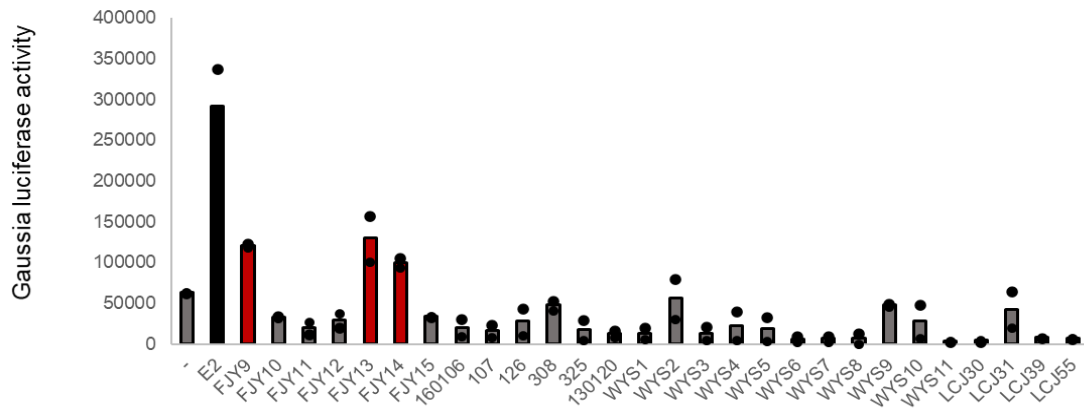
結果は平均値±標準偏差で示した。2 標本間の有意差検定には Student's t-test、多群間の比較には Tukey-Kramer's test の多重比較を用いて解析し、有意水準 $p < 0.01$ を統計的に有意とみなした。解析は KaleidaGraph Synergy Software で行った。

1-3. 結果

1-3-1. ER α 部分アゴニスト作用の探索

東邦大学薬学部生薬学教室より提供頂いた 298 種の化合物ライブラリー (表 1S) を用いて、二段階のレポーターアッセイを実施し、ER α 部分アゴニスト活性を示す化合物をスクリーニングした。まず、*Gussia*-luciferase reporter assay (Mammalian one-hybrid assay) を用いて ER α に対するリガンド応答性を一次スクリーニングした (Fig. 6)。その結果、同時に測定された溶媒コントロールと比較して、1.5 倍以上のレポーター活性の上昇が認められた化合物が 65 種見つかった (Fig. 6 青および赤色カラム)。さらに、同時に測定されたポジティブコントロール (E2) の活性を 100%とした場合に、20%以上の活性を示したものが 32 種該当した (Fig. 6 赤色カラム)。本研究では、これらの条件に該当する化合物が多数含まれる 2-arylbenzofuran 構造を足場として有する化合物群 (化合物 T シリーズ) を、潜在的な ER α に対するリガンド応答性を示す化合物候補として選出した (Fig. 7)。





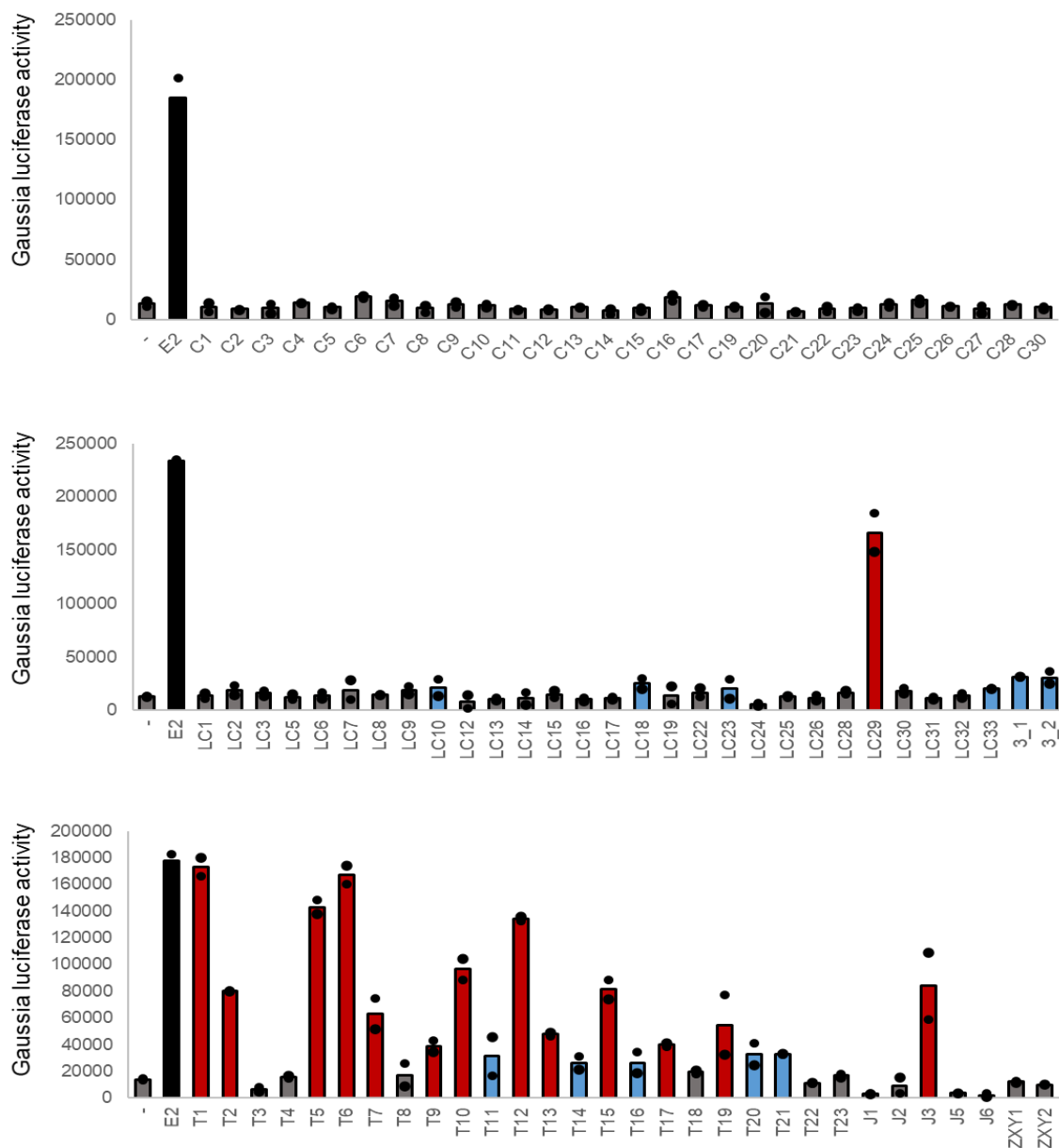


Fig. 6. ER α に対するリガンド活性の評価

HEK293 細胞に GAL4/DBD-ER α /LBD expression vector および GAL-RE *Gaussia-luc* reporter vector をトランスフェクションした翌日、被験物質 (10 μ M) および E2 (10 nM) を処置した。24 時間後に培養上清を回収し、*Gaussia-luciferase* 活性を測定した。結果は、異なる 2 well の平均活性値を示している (n=2)。同じプレート内で測定された溶媒コントロールと比較して、1.5 倍以上のレポーター活性の上昇が認められた化合物を色つき (青または赤) で示し、同時に測定されたポジティブコントロール (E2) の活性を 100% とした場合に、20% 以上の活性を示したものを赤色で示している。

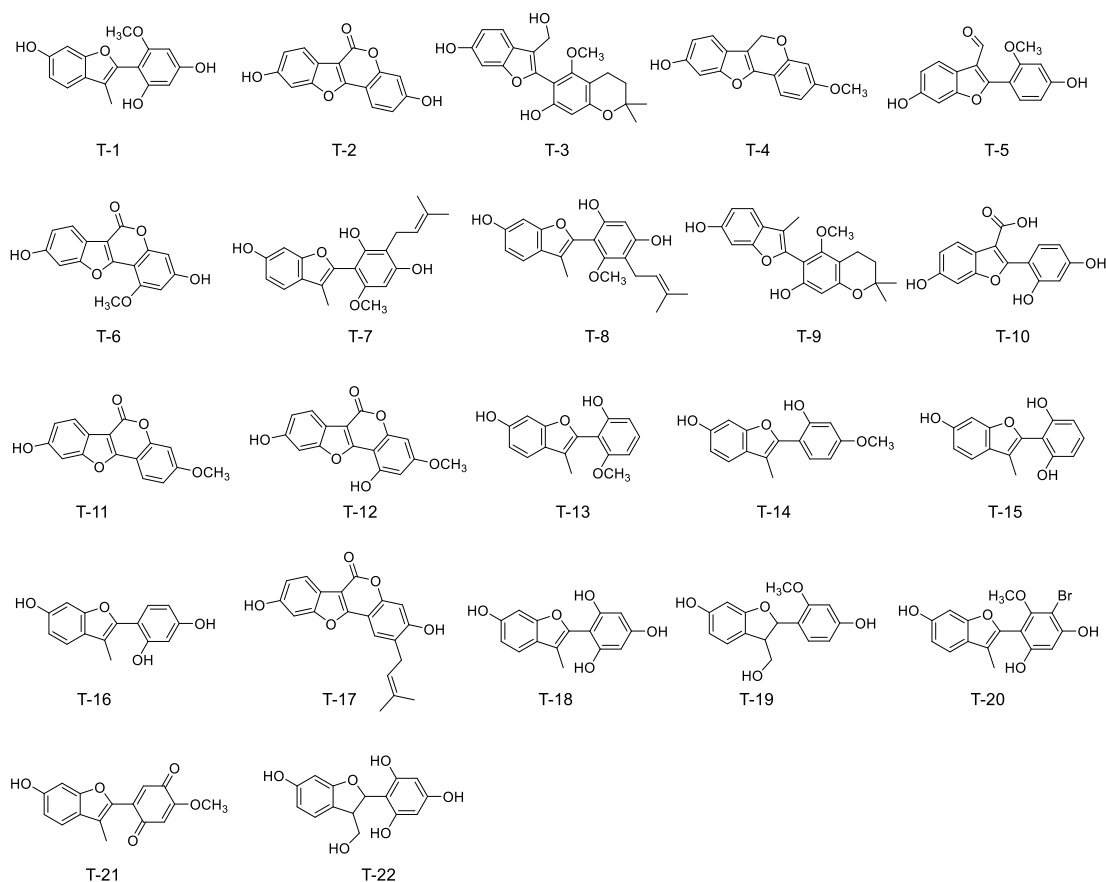


Fig. 7. 2-arylbenzofuran 含有化合物群(化合物 T シリーズ)の化学構造式

化合物 T シリーズ (**T1**~**T22**) は、一連の 2-arylbenzofuran 含有天然物とその誘導体であり、Tang Y らによって以前に報告された cascade [3,3]-sigmatropic rearrangement/aromatization strategy を利用して化学的に合成された化合物である (Fig. 7) [42]。一次スクリーニング (GAL-RE *Gaussia*-luciferase reporter assay) では、試験濃度を 10 μ M に設定した。**T1**、**T5** および **T6** 処置において、ER α のフルアゴニストである 17 β -estradiol (E2) に匹敵する強力な ER α アゴニスト活性を示したが、細胞毒性作用は観察されなかった。しかし本研究では、SERM 候補化合物として完全なアンタゴニストまたはアゴニストではなく、ER α の部分アゴニストを探索していることより、以降のスクリーニングから上記 3 種の化合物は除外した。

次いで、E2 と比較をして 20-80%の部分的リガンド活性を示した化合物 **T2**、**T7**、**T9**、**T10**、**T12**、**T13**、**T15**、**T17** および **T19** を選出し、ERE-luciferase reporter assay による ER α アゴニスト活性化作用について二次スクリーニングを行った (Fig. 8)。その結果、5 つ

の化合物 (**T2**、**T7**、**T9**、**T10** および **T12**) は、E2 と比較して部分的な ER α アゴニスト作用を示すことが明らかとなった。

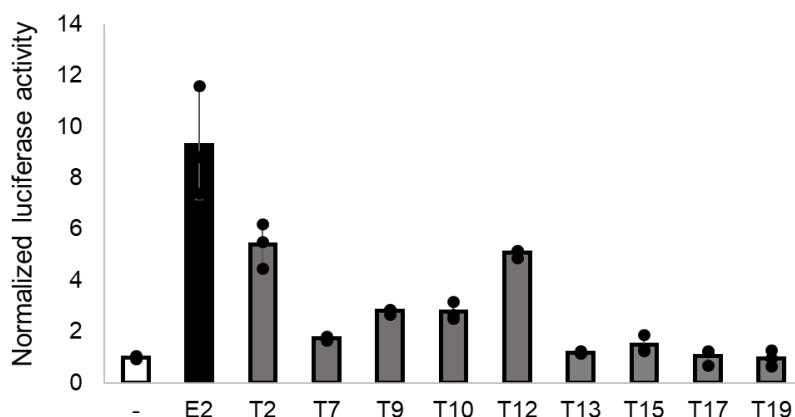


Fig. 8. 化合物 T1-T22 による ER α の転写活性化作用に対する影響

HEK293 細胞に、ER α expression vector、ERE-luc. reporter vector および pGL4.74 をトランスフェクションし、その翌日、溶媒 (0.1% DMSO)、化合物 T (10 μ M) または E2 (10 nM) を処置し、24 時間後に細胞を溶解して luciferase 活性を測定した。結果は、*Renilla* の値によって補正した後、溶媒コントロールに対する誘導倍率を示した (mean \pm S.D., n=3)。

1-3-2 ER α 陽性乳がんのエストロゲン依存的細胞増殖抑制作用のスクリーニング

1-3-1 において、E2 と比較をして 20-80%の部分的リガンド活性を示した化合物 **T2**、**T7**、**T9**、**T10**、**T12**、**T13**、**T15**、**T17** および **T19** (Fig. 8) による ER α 陽性乳がんの細胞増殖に対する影響を MTS assay により評価した (Fig. 9)。その結果、E2 と同じように細胞増殖促進作用を示す化合物が多く認められた。一方で、**T9** に関しては細胞増殖に対する影響は認められなかった。

次に、これらの化合物群を E2 と共処置することによって、E2 依存的な細胞増殖に対する化合物群の影響を評価することにした。その結果、ほとんどの化合物が E2 依存的な細胞増殖を促進または維持したのに対し、**T9** はエストロゲン依存的な細胞増殖を抑制することが明らかとなった。これらの結果より、**T9** (10-dehydroxyglycyuralin E) を新たなタイプの ER α リガンドの候補化合物として選出した。

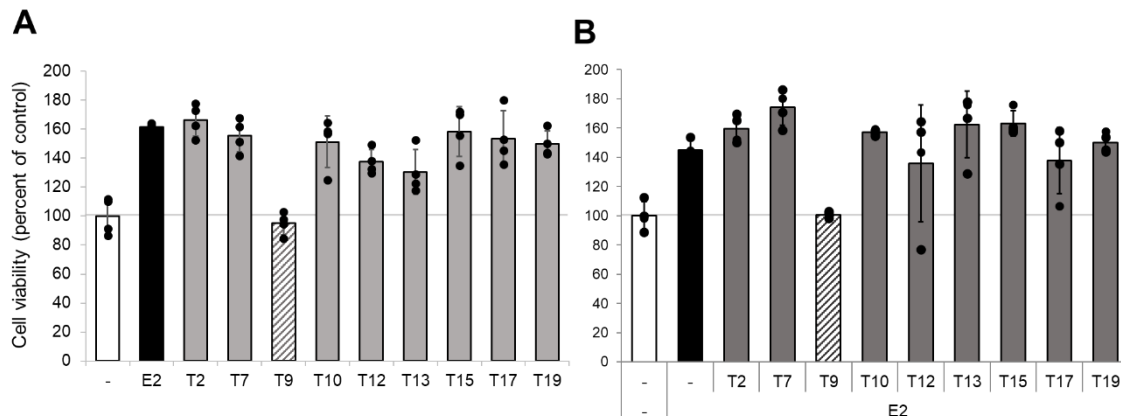


Fig. 9. 化合物 T によるエストロゲン依存的細胞増殖へ影響

MCF-7 細胞を 5% csFBS 含有 DMEM/- 培地を用いて播種した。その翌日、E2 (10 nM) の非存在下(A)または存在下(B)で化合物 T(10 μ M)を処置した。72 時間培養後、細胞生存率を MTS assay で測定した(mean \pm S.D., n=4)。

1-3-3 T9 の化学合成

Supplementary data に記載

1-3-4 ER α 選択的なアゴニスト活性化作用

T9 による ER のサブタイプ選択性を調べるために、HEK293 細胞に ER α または ER β を発現させて、ERE-luc. reporter assay を実施した。その結果、ER α および ER β ともに T9 濃度依存的なレポーター活性の上昇が認められた。また、E2 と共処置した結果、10 μ M の T9 処置下において E2 によって促進された ER α の転写活性に対する抑制作用が認められた (Fig. 10A)。対照的に、同じ濃度の T9 処置による ER β の転写活性に対する抑制作用は認められなかった (Fig. 10B)。これらの結果より、T9 は ER α のサブタイプ選択的なリガンドであることが示唆された。

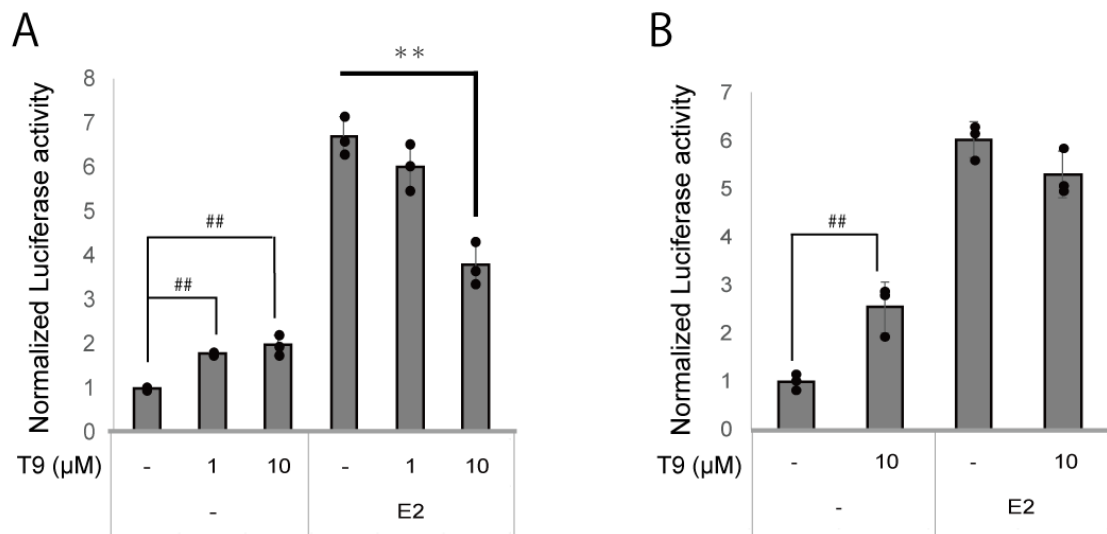


Fig. 10. ER α および ER β を介した転写活性化作用に対する T9 の影響

HEK293 細胞に、ER α (A) または ER β (B) expression vector、ERE-luc. reporter vector および pGL4.74 をトランスフェクションした。その翌日、示した濃度の T9 または E2 (10 nM) を処置し、24 時間培養した後、luciferase 活性を測定した (mean \pm S.D., n=3, ** p < 0.01, ## p < 0.01)。

次に、MCF-7 細胞における ER α 標的遺伝子である *growth regulation by estrogen in breast cancer 1* (*GREB1*) [43,44] 誘導に対する T9 の影響を検討した。その結果、T9 の前処置によって、E2 による *GREB1* mRNA 発現誘導の抑制が認められた (Fig. 11A)。したがって、T9 は MCF-7 細胞において ER α のアンタゴニストとして作用することが示唆された。また、ER は E2 による活性制御を受けた後、タンパク質分解されることが知られていることより、ER α タンパク質発現に対する T9 の影響を検討した。その結果、E2 処置によって ER α のタンパク質発現の減弱が認められたが、T9 による ER α タンパク質の発現レベルの変動は認められなかった (Fig. 11B)。

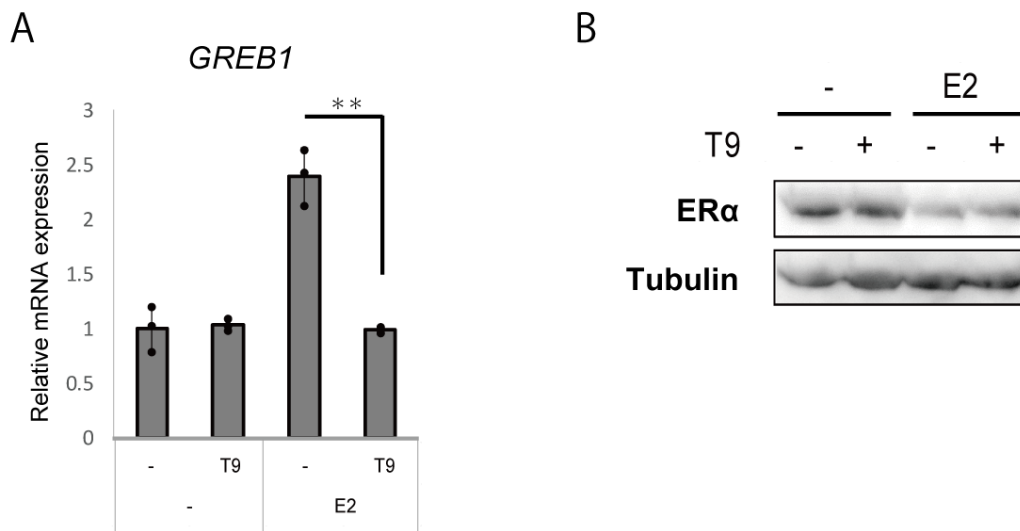


Fig. 11. ERα を媒介した遺伝子発現および ERα タンパク質レベルに対する T9 の影響

MCF-7細胞にT9 を30分間前処置した後、E2を処置して6時間後に細胞を回収した。(A) *GREB1*のmRNA発現量をRT-qPCRを用いて測定した。結果は、内部標準とした β -actinで補正され、溶媒コントロールを1として表している (mean \pm S.D., n=3, ** p < 0.01)。(B)細胞を溶解してタンパク質を回収し、ウエスタンブロット法でERαおよびtubulinのタンパク質のバンドを検出した。

1-3-4 ドッキングシミュレーション

T9 と ERα の結合パターンを調べるために分子ドッキングシミュレーションを行った。ドッキング研究では、ネイティブリガンド ([5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1-benzofuran-7-yl]acetonitrile) と複合体を形成した ERα の結晶構造を受容体モデルとして用いて、T9 と受容体間の予測される相互作用を計算した。T9 の最適な結合親和性を示すドッキングポーズを分析し、共結晶リガンドのポーズと比較した結果、ネイティブリガンドまたは T9 と ERα の結合エネルギーはそれぞれ-7.13 kcal/mol、-8.88 kcal/mol だった。T9/ERα 結合における結合ポケットを調べた結果、共結晶構造でも観察された水素結合相互作用に関与するアミノ酸残基が保存されている一方で、T9 の benzofuran における OH 基が Glu353 と相互作用し、水素結合ドナーとして機能することがわかった。さらに、共通して Leu349、Leu346、Leu391、Leu428、Met343 など複数のアミノ酸残基が疎水性相互作用に関与していた (Fig. 12)。さらに、結合親和性が最も低いドッキングコンフォメーションの T9 で生成された表面は、アクセプターによく適合し、T9 が ERα と直接接触して生物活性を発揮することが示唆された (Fig. 12., 13)。

1-4. 考察

本章では、ER α の新規リガンドの探索を行うために、東邦大学薬学部生薬学教室より提供頂いた 298 種の化合物ライブラリーを用いて、二段階の reporter assay を実施した。まず、ER α に対するリガンド応答性を *Gaussia-luciferase reporter assay* (Mammalian one-hybrid assay) を用いて、一次スクリーニングした結果、2-(3-methylbenzofuran-2-yl)phenol 構造を足場とした化合物 T シリーズを見出すことに成功した (Fig. 7)。その中には、ER α のフルアゴニストである E2 に匹敵する強力な ER α アゴニスト活性を示した化合物 (T1、T5、T6) も含まれていた。しかしながら、本章の目的である「ER α の有益な作用を発揮する適度な活性 (部分アゴニスト) を示す新たな ER α リガンド」の探索のため、E2 と比較をして 20-80% の部分的リガンド活性を示した化合物 T2、T7、T9、T10、T12、T13、T15、T17 および T19 を目的の候補化合物として選出した。さらに、ERE-luc. reporter assay を用いて、選出した候補化合物の ER α を介した転写活性化作用について二次スクリーニングを行った結果、5 つの化合物 T2、T7、T9、T10 および T12 において、E2 と比較して 15~60% のレポーター活性が認められた。以上の結果より、化合物 T2、T7、T9、T10、および T12 を ER α の部分アゴニスト候補化合物として選出した (Fig. 8)。

ER α 陽性乳がんの治療効果として、エストロゲン依存的な細胞増殖に対する化合物 T シリーズによる影響を MTS assay により評価した (Fig. 9)。E2 と比較して 20-80% の部分的リガンド活性を示した化合物 T2、T7、T9、T10、T12、T13、T15、T17 および T19 (Fig. 8) を用いて、まず ER α 陽性乳がん細胞に対する増殖促進作用について評価した結果、多数の化合物において E2 と同様にがん細胞増殖促進作用を示したが、T9 処置による細胞増殖に対する影響は認められなかった。さらに、これら化合物群を E2 と共処置した結果、ほとんどの化合物が E2 依存的な細胞増殖を促進または維持したのに対し、T9 は E2 依存的な細胞増殖を抑制することが明らかとなった。以上の結果より、T9 は ER α の部分アゴニスト活性を示す一方で、エストロゲン依存的な乳がん細胞増殖抑制作用 (アンタゴニスト作用) を示す化合物であることが示唆された。

ER には、ER α と ER β の異なるサブタイプが存在し、ともに E2 と結合して活性制御を受けるとされている。しかしながら、それらの機能や発現に相違が認められており、本研究で着目している ER 陽性乳がんにおいても ER α の発現が優位であることが報告されている [45]。したがって、T9 による ER のサブタイプ選択性を調べることにした。HEK293 細胞に ER α または ER β を発現させて、それぞれの転写活性化作用を比較した

結果、ER α および ER β ともに **T9** 濃度依存的なレポーター活性の上昇が認められ、どちらのサブタイプにおいても、E2 処置により上昇したレポーター活性の 50%に満たないことが明らかとなった。さらに、E2 と共処置した結果、10 μ M の **T9** 処置下において E2 によって促進された ER α の転写活性に対する抑制作用が認められたが、その一方で、同じ濃度の **T9** 処置下においては、ER β の転写活性に対する抑制作用は認められなかった (Fig. 10)。これらの結果より、**T9** は ER α のサブタイプ選択的部分アゴニストである可能性が示された。また、**T9** と ER α の結合様式をシミュレーションした結果、**T9** は ER α と直接結合し生物活性を発揮する可能性を示すことができた (Fig. 12、13)。

本研究では、エストロゲンによる乳がん増殖関連遺伝子である *GREB1* に対する **T9** の影響を検討した。その結果、**T9** 処置による *GREB1* の誘導は認められなかったが、**T9** は、E2 による *GREB1* の誘導を阻害することが明らかとなった (Fig. 11)。また、**T9** 処置の有無で ER α タンパク質発現量への影響は認められなかった。これらの結果は、**T9** が MCF-7 細胞のエストロゲン依存的な細胞増殖に対して ER α のアンタゴニストとして作用する可能性を支持するものであると考えられる。

本章では、ER α の新規リガンドとして、2-(3-methylbenzofuran-2-yl)phenol 構造を足場とした化合物 T シリーズを見出した。さらに、核内受容体の分子機構を基盤としたスクリーニング法の構築により、乳がん組織において ER α の部分アゴニスト活性を保持しつつ、エストロゲン依存的細胞増殖に対してアンタゴニスト作用 (細胞増殖抑制作用) を示すリガンドのシード化合物 **T9** (10-dehydrooxyglycyuralin E) を同定することができた。これらの結果より、同一組織内においても、ER α の機能を選択的に発現可能なりガンドの探索が可能であることが示唆された。本研究では、各化合物による一般的な ER α を介した転写活性化作用を評価するために、コンセンサスな ERE を導入した reporter vector を用いたが、その際に ER α の部分アゴニスト活性を示した化合物 **T9** は、エストロゲン依存的な細胞増殖およびその関連遺伝子の発現に対しては、アンタゴニスト作用を示した。これらの結果より、同一組織 (同一細胞) 内において、ER α の様々な標的遺伝子依存的なプロモーターや応答配列の環境によって、ER α がアゴニストまたはアンタゴニストとして選択的に機能する可能性が考えられた。これまでの SERM の組織選択性を示す基本的な分子メカニズムとしては、組織ごとの転写共役因子の発現や組成に起因するものであると考えられてきた [20]。しかしながら、本研究の結果より、同じ組成の転写共役因子が存在する細胞内において、各標的遺伝子の転写制御における転写複合体の形成が ER α に結合するリガンドに依存して選択的に変動している可能性が考えら

れた。

本章の結果より推察される新たなタイプの ER α リガンドは、ER α の選択的機能発現の分子メカニズムの解明のツールとして有用であると考えられる。今後、この分子メカニズムの解明および ER α の有益な機能が実際に認めれるかを証明することによって、より優れた乳がん治療薬の開発につながることを期待される。

第2章

芳香族炭化水素受容体（AHR）アゴニストによる
乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用

2-1. 序論

AHR ノックアウトマウスなどを用いた研究により、ダイオキシン類の曝露による胸腺萎縮による免疫系異常、口蓋裂などの催奇形性、発がん、肝毒性などといった様々な毒性作用に AHR が関与していることが明らかにされている [11,46–48]。その一方で近年、発生や免疫応答、がん抑制など正常な生物学的機能に関する報告が相次いでいる (Fig. 14)。AHR は環境化学物質などの外来性リガンドだけでなく、食物由来のトリプトファン代謝物の kynurenine (KYN) [49] や 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) [50]、インドール含有化合物の indirubin や indigo [51]、bilirubin [52] など様々な化合物が AHR の内因性リガンドの候補として報告されている [11,53]。齧歯類において、アブラナ科野菜に高濃度で含まれるグルコブラシシンの代謝産物である indole-3-carbinol (I3C) の腹腔内投与により、AHR シグナル伝達の活性化を介して、腸内の抗炎症性サイトカイン (interleukin (IL) -22) が誘導され、デキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎の軽減作用を示すことが報告されている [54]。また、indigo の経口投与により、同じく抗炎症性サイトカインである IL-10 や IL-22 を誘導することによって潰瘍性大腸炎を改善することが報告されており、AHR の有益な機能の臨床応用が期待されている [55]。

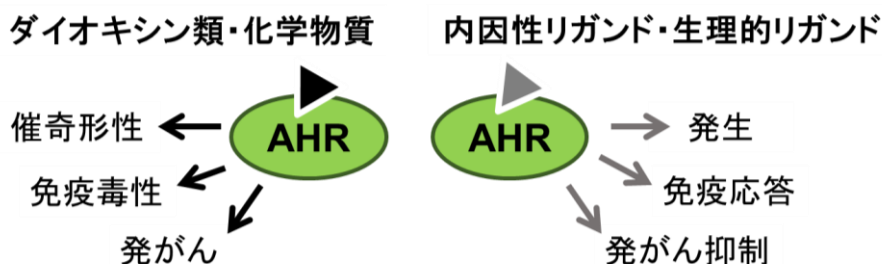


Fig. 14. AHR による多様な機能

手術不能ながんの多くは化学療法、放射線療法などで治療されるが、完全に腫瘍細胞を排除することは極めて難しく、多くの場合で治療抵抗性細胞が残存し、再発・転移してしまうことが大きな問題とされている。それらの原因として近年提唱されているのが、がん幹細胞仮説である[56,57] (Fig. 15)。腫瘍組織中においても正常組織と同様な幹細胞が存在し、それら一部の細胞集団は治療抵抗性を示すだけでなく、自己複製することによってまた元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力を持つ [56,58,59]。腫瘍中のがん

細胞を実験動物に移植しても腫瘍形成が起こらないが、先述した一部の細胞集団（がん幹細胞）を移植すると腫瘍の形成が認められることが明らかにされている[58]。このようながん幹細胞は乳がんにおいてもその存在が報告されており、幹細胞の特性を示す細胞表面マーカーCD44⁺/CD24^{low}/lin⁻の発現を特徴とする細胞集団がヒト乳がんに含まれていることを示している [60,61]。したがって、がん幹細胞を標的とした治療法を確立は、再発や転移のリスクの少ないがん根治療法へとつながることが期待される。

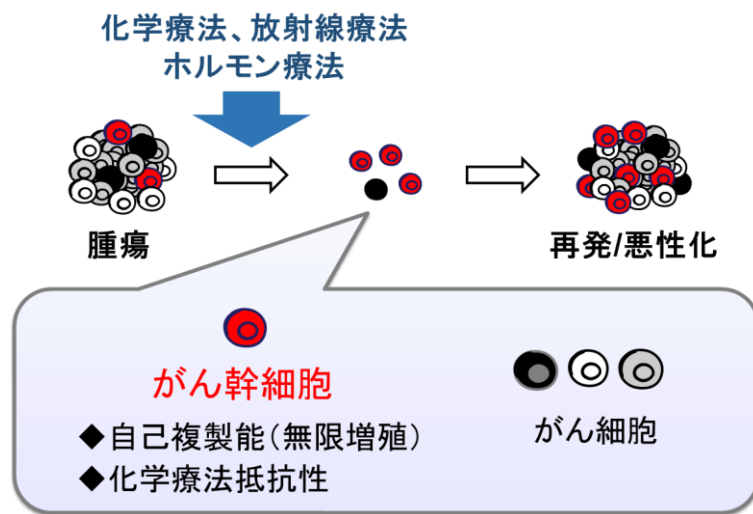


Fig. 15. がん幹細胞仮説

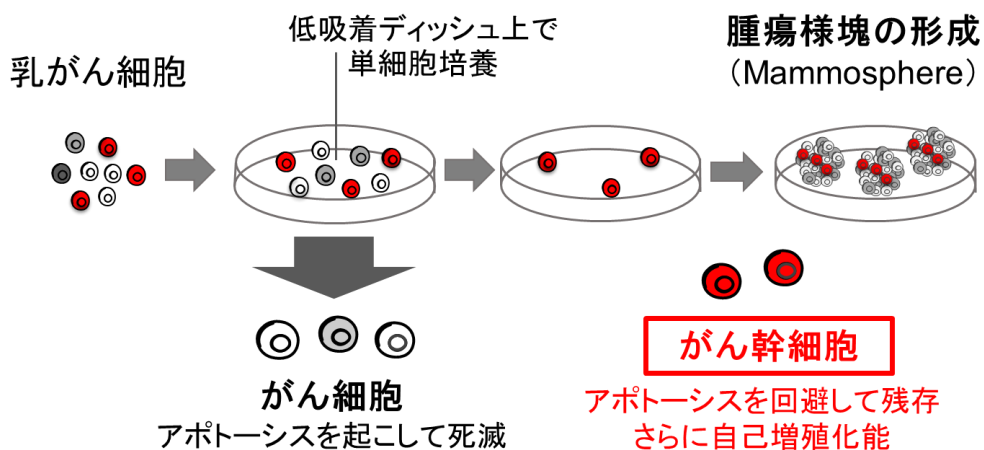


Fig. 16. Mammosphere formation assay

stemness な性質の評価に用いられる一般的な手法を利用した非接着性の無血清条件下における正常な乳腺幹細胞の *in vitro* 濃縮は、神経幹細胞培養方法をもとに最初に報告された [62,63]。低吸着プレート上で細胞密度を下げて単細胞の状態で培養すると、ほとんどの細胞は細胞同士やディッシュとの接触不全により誘発されるアポトーシス（アノイキス）を受けるが、まれな細胞は分裂して自己増殖することにより、産生された細胞もアノイキスを回避することが可能となりスフェロイド構造（mammosphere）を形成する（Fig. 16）。さらに、原発性乳房腫瘍、転移、樹立された細胞株 [64–66]の細胞においてもスフェロイド形成が報告され、腫瘍の増加によってがん幹細胞表現型の細胞が mammosphere に富むことが示された。

当教室ではこの培養法を利用し、AHR のアゴニストである合成フラボノイド β -naphthoflavone（ β NF）処置により活性化した AHR が、乳がん幹細胞による腫瘍様塊形成を抑制することを明らかにしており [67]、AHR が乳がんの根治療法として有用な治療標的となる可能性を提示している（Fig. 17）。

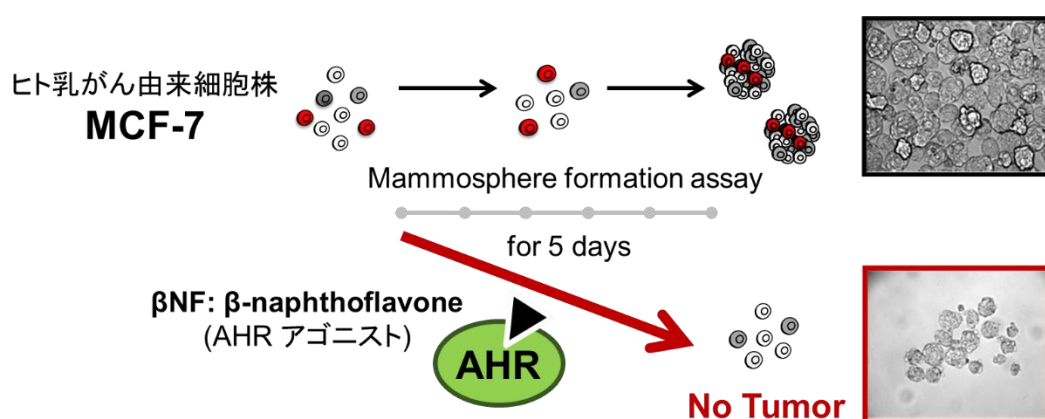
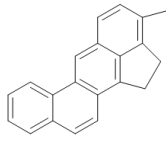


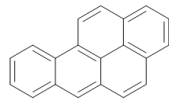
Fig. 17. β NF 処理による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用(先行研究)

しかしながら、AHR を治療標的として活性化させた場合、先述した毒性学的機能の発現が問題となる。その解決策として、本研究で基盤としているような核内受容体に対する「選択的機能調節薬の概念」を構造が異なる AHR に置き換えて応用できるのではないかと考えた。そこで本章では、この AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用の治療応用化を目指す一環として、既知 AHR アゴニストを用いて本作用を選択的に発現するリガンドの存在を証明することを目的とした。9 種の既知 AHR アゴニスト（Fig. 18）を用いて腫瘍様塊形成抑制作用に対する影響を評価し、典型的な AHR 機能の 1 つの指標として転写活性化作用を同様に評価し、2 つの作用について比較をした。

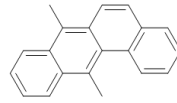
多環芳香族炭化水素類(PHAs)



3MC
3-methylcholanthrene

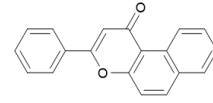


BaP
benzo[a]pyrene



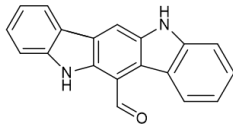
DMBA
7,12-dimethyl[a]anthracene

合成フラボノイド

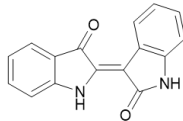


βNF
β-naphthoflavone

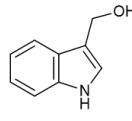
トリプトファン誘導体・インドール誘導体



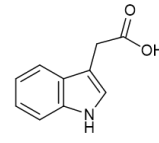
FICZ
6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole



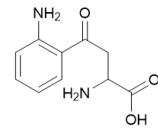
Indirubin



I3C
indole-3-carbinol



IAA
indole-3-acetic acid



KYN
kynurenine

Fig. 18. 本章で用いた AHR アゴニストの化学構造式

2-2. 方法

2-2-1. 使用化合物

表 6.

化合物名	略名	メーカー	Ref
β -Naphthoflavone	β NF	Sigma-Aldrich	[68,69]
3-Methylcholanthrene	3MC	Sigma-Aldrich	[70]
Benzo[<i>a</i>]pyrene	BaP	Tokyo Chemical Industry	[71]
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	DMBA	Sigma-Aldrich	[72]
6-Formylindolo[3,2- <i>b</i>]carbazole	FICZ	Enzo Life Sciences	[50,73,74]
Indirubin	-	Biomol GmbH	[51,75]
Kynurenine	KYN	Tokyo Chemical Industry	[49,76,77]
Indole-3-carbinol	I3C	Tokyo Chemical Industry	[78,79]
Indole-3-acetic acid	IAA	Tokyo Chemical Industry	[80,81]
Dimethyl Sulfoxide	DMSO	Wako	

2-2-2. AHR-knockout (AHR-KO) 細胞の樹立

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから入手したヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 における AHR 遺伝子のノックアウトは、CRISPR/Cas9 法を用いて行った。

《プラスミドの作製》

Single guide RNA (sgRNA) の配列は、CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) [82] を使用して、ヒト AHR の 2 番目のエクソンを標的として設計された (5'-ccggGTAAAGCCAATCCCAGCTGA-3'/5'-aacTCAGCTGGGATTGGCTTTAC-3')。それぞれの sgRNA をコードする DNA 鎖 1 μ L (100 μ M) にアニーリングバッファー 8 μ L を加え、その溶液を 95°C で 2 分間インキュベートした後、徐々に室温まで下げることでアニーリングを行った。アニーリングした DNA は、アニーリングバッファーで 100 倍希釈した。1.5 mL チューブに希釈済みのアニーリングした DNA (0.25 μ L)、pGuide-it-ZsGreen Vector ベクター (Clontech Laboratories) (0.5 μ L)、PCR グレード水 (0.5 μ L)、DNA Ligation Mighty Mix (1.25 μ L) を加えて合計 2.5 μ L とした。16°C で 30 分間ライゲーションした後、100 μ L の ECOSTM X Competent E. coli DH5 α (NIPPON GENE) を加え

て氷上で 30 分間反応させた。42°C で 45 秒間ヒートショックを行い、氷上で 10 分間インキュベートした後、アンピシリン含有 LB Broth Base (LB, Invitrogen) 寒天培地プレートに塗り広げ、37°C のインキュベーター内で一晩培養した。翌日、アンピシリン含有 LB 培地 3 mL が入った遠心管にプレートに生じたコロニーをピックアップしたチップを入れ、37°C で一晩振とう液体培養した。翌日、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics) を用いて、プロトコール通りにプラスミド (pGuide it AHR-KO#2) を抽出した。

《MCF-7 AHR-KO 細胞の樹立》

L-グルタミン、フェノールレッド (PR) 不含有 DMEM High Glucose (DMEM/PR-, Wako) 500 μ L に 5 ng の pGuide it AHR-KO#2、トランスフェクション試薬として PEI Max reagent (Polysciences) を 30 μ L を加えて、攪拌した後、室温で 15 分間インキュベートしたものをトランスフェクションミックスとした。その後、60 mm dish に MCF-7 細胞を播種すると同時に、トランスフェクションミックスを加えて 2 日間培養した。pGuide it AHR-KO#2 プラスミドは、蛍光タンパク質である ZsGreen を発現するため、蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1, Zeiss) で蛍光タンパク質が発現していることを確認した後、セルローター (JSAN JR Swift, Bay Bioscience) を用いて、蛍光タンパク質が発現している細胞を分離し、シングルセルクローニングを行った。得られた各クローンのタンパク質を回収し、ウエスタンブロット (2-2-5.) で AHR が発現していないことが確認されたクローンを MCF-7 AHR-KO 細胞として樹立した。

2-2-3. 細胞培養

ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクより購入した。MCF-7 は、5% のウシ胎児血清 (FBS, Gibco)、100U/mL penicillin および 100 μ g/mL streptomycin (Pen Strep, Gibco) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose (DMEM, Wako) を用いて、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

2-2-4. プラスミド構築

XRE 配列を含む reporter vector (XRE-luc) は、pGL3promoter vector (Promega) のマルチクローニングサイトに以下の DNA 配列をアニーリングし、組み込んだプラスミドである (下線は XRE 配列を示す) [83]。

5'-GATCTTGCGTGACAAGCCTTGCGTGACAAGCTTGCGTGACAAGCTTGCGTGAC-3'
5'-GATCGTCACGCAAGCTTGTCACGCAAGCTTGTCACGCAAGGGCTTGTCACGCAA-3'

2-2-5. SDS-PAGE/ ウェスタンブロット

培養した細胞から培養液をアスピレーターで除去した後、SDS サンプルバッファーを加えて細胞を溶解し、1.5 mL チューブに移した。ピペッティングにより DNA を切断した後、98°C で 5 分間熱変性を行い、4°C で冷却した。Ionic Detergent Compatibility (Thermo Fisher Science) を加えた Pierce® 660 nm Protein assay Reagent (Thermo Fisher Science) 150 µL に、検量線用 BSA (1 µg/µL) を 0、1、2、5 µL、サンプルをそれぞれ 2 µL ずつ加えた。攪拌し室温で 5 分間静置した後、660 nm で吸光度を測定し、検量線を作製してサンプル濃度を算出した。

7.5% の分離ゲルおよび 4.5% の濃縮ゲルを作製 (表 7) し、泳動バッファー (1×TGS) を電気泳動装置 (ATTO) に入れ、30 mA の電流で 10 分間のプレランニングを行った。その後、サンプルをゲルにアプライし、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。転写バッファーにゲルを浸して 10 分間振とうさせた。メタノールで親水処理した後、転写バッファーで平衡化しておいた Immobilon-P メンブレン (MERCK Millipore) にゲルをのせ、200 mA で 30 分間ブロッティングした。メンブレンを Ez Block chemi (ATTO) に浸し、30 分間室温で振とうし、ブロッキングした。その後、PBS-T で 1 次抗体を希釈した抗体希釈液で 1 時間以上もしくは 4°C で一晩 1 次抗体反応を行った。その後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 2 回行い、PBS-T で 2 次抗体 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technologies) を 4000 倍希釈した抗体希釈液で 1 時間以上もしくは 4°C で一晩 2 次抗体反応を行った。メンブレンは PBS-T で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、Luminata Crescendo Western HRP Substrate (MERCK Millipore) を均一に滴下し、WSE-6100H LuminoGraph I (ATTO) を用いて撮影した後、画像解析ソフトウェア Image J (National Institutes of Health) によってバンドの強度を解析した。以下に SDS PAGE に用いたゲルおよび試薬の組成、使用した 1 次抗体と免疫原、希釈倍率を示す。

表 7.

試薬	7.5% 分離ゲル (mL)	4.5% 濃縮ゲル (mL)
MilliQ 水	2.8	1.64
40%アクリルアミド/ビス混合液 (nacalai tesque)	0.94	0.281
EzGel Ace (ATTO)	1.25	0.3
10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS, Wako)	0.1	0.05

N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED, Wako)	0.005	0.005
---	-------	-------

表 8.

試薬	組成
SDS サンプルバッファー	125 mM Tris-HCl pH6.8、4% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、20% Glycerol、0.01% Bromophenol blue、10% Dithiothreitol
10×Tris-Glycine-SDS (TGS)	250 mM Tris、1.92 M Glycine、1% SDS
1×TGS (泳動バッファー)	10×TGS を蒸留水で 10 倍希釈して調整
10×Tris-Glycine-HCl (TGH)	250 mM Tris、1.92 M Glycine、HCl で pH8.4 に調整
転写バッファー	10×TGH 50 mL、MeOH 75 mL、蒸留水で 500 mL に調整
10×Phosphate Buffered Saline (PBS)	1.37 M NaCl、26.8 mM KCl、84.4 mM Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O、14.7 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	10×PBS を蒸留水で 10 倍希釈し、0.1% Tween-20 (MP Biomedicals) を加えて調整

表 9.

1 次抗体	希釈倍率	メーカー
AHR (D5S6H) Rabbit mAb	2,000	Cell Signaling Technology
Anti- α -Tubulin HRP DirectT	10,000	MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD (MBL)

2-2-6. Mammosphere formation assay

《MammoCult Medium の調製法》

MammoCult Basal Medium (Human) に MammoCult Proliferation Supplement (Human) (StemCell Technologies) を 9:1 の割合で添加した。さらに、hydrocortisone (0.48 μ g/mL) と heparin (4 μ g/mL/0.0004%) を添加したものを MammoCult Medium とした。

《Mammosphere formation assay および薬剤処置》

各薬剤を DMSO 溶媒で溶解し、表 10 に示した濃度（調製濃度）に調製した。1.5 mL チューブに調製した薬剤および溶媒(DMSO)を 0.5 μ L ずつ入れ、それぞれに MammoCult Medium 250 μ L を加えて希釈 (2 \times 最終濃度) し、96 well Ultra-Low Adherent Plates (Corning) に 50 μ L/well ずつ 4 well に分注した。

表 10.

薬剤	調製濃度 (in DMSO)	最終濃度 (0.1% DMSO)
β NF	0.1/ 1/10 mM	0.1/ 1/10 μ M
3MC	0.01/0.1/1 mM	0.01/0.1/1 μ M
BaP	0.01/0.1/1 mM	0.01/0.1/1 μ M
DMBA	0.1/ 1/10 mM	0.1/ 1/10 μ M
FICZ	0.001/0.01/0.1 mM	0.001/0.01/0.1 μ M
Indirubin	0.001/0.01/0.1 mM	0.001/0.01/0.1 μ M
I3C	1/10/100 mM	1/10/100 μ M
IAA	1/10/100 mM	1/10/100 μ M
KYN	1/10/100 mM	1/10/100 μ M

60 mm dish に 80~90%コンフルエントの細胞を用意し、細胞から培養液をアスピレーターで除去した後、0.25 w/v% トリプシン (Wako) 0.75 mL を加えて 37°C で 5 分間インキュベートして細胞をはがした。DMEM を 2 mL 加えて 15 mL 遠心管に細胞液を移し、500 \times g で 2 分間遠心した。アスピレーターで上清を除去後、MammoCult Medium 1 mL を加えてピペッティングにより single cell にし、さらに MammoCult Medium 3 mL を加えて懸濁した。細胞数をカウントして 2 \times 10⁴ cells/mL の細胞懸濁液を 2500 μ L 調製した。薬剤を分注済みの 96 well Ultra-Low Adherent Plates に、先端をカットして面積を広げたチップを用いて調製した細胞懸濁液を 1 well あたり 50 μ L ずつ分注し、細胞播種および薬剤処置を行い、37°C、5% CO₂ 下で 5 日間培養した。

2-2-7. MTS assay

CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega)

細胞を 1×10^4 cells/mL の濃度で 96 well plate に播種し、翌日に調製した薬剤および溶媒 (0.1% DMSO) を最終濃度になるように処置した。72 時間後、1 well あたり 20 μ L の CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (テトラゾリウム化合物) に等量のチャコール培地を加えて調製した試液を、薬剤処置した細胞に 1 well あたり 40 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂ 下で 1 時間インキュベート後、波長 490 nm でそれぞれ測定した。

1-2-8. XRE-luciferase reporter assay

1 well あたり 12.5 μ L の DMEM/PR- に XRE luc プラスミド (0.05 μ g)、pGL4.74[hRluc/TK] (0.01 μ g)、トランスフェクション試薬として PEI Max reagent を総 DNA 量の 5 倍量 (0.3 μ L) を加え、15 分間インキュベートした。その後、MCF-7 細胞と混ぜ合わせ、96 well プレートに播種した。翌日、細胞に溶媒 (0.1% DMSO) および各薬剤 (最終濃度) を処置し、6 時間または 24 時間後に培地を除去した後、1×PLB (25 μ L) で細胞を溶解した。

ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。細胞溶解液は、MilliQ 水で 5 倍希釈した Passive Lysis Buffer (1×PLB) を用いた。Luciferase Assay Substrate 1 vial に Luciferase Assay Buffer II を加え LAB 溶液とし、Stop & Glo Buffer に Stop & Glo Substrate (SG) を 100 分の 1 の量を加え、SG+溶液とした。

培地を除去したプレートに 1×PLB (25 μ L) を添加し、20 分間振とうし、細胞を溶解した。その細胞溶解液 5 μ L を測定チューブに移し、15 μ L の LAB を加えてピペッティングし、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。その後、15 μ L の SG+ を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。このウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部標準として補正を行った。装置は Smart Light Lumino meter (Molecular Light Technology) を用いた。

2-2-8. RNA 抽出

培養プレートの培地を除去し、ISOGEN II (NIPPON GENE) を添加 (24 well plate : 125 μ L) した後、5 分間振とうした。溶液を 1.5 mL チューブに回収し、MilliQ 水を添加 (24 well plate : 50 μ L) し、混和した後、5 分間静置した。15000 rpm で 15 分間遠心し、上清

を回収 (24 well plate : 125 μ L) した後、そこに等量の 70% エタノールを添加し、転倒混和した。15000 rpm で 10 分間遠心し RNA を沈殿させた。上清を除去し 500 μ L の 70% エタノールを添加し、15000 rpm で 5 分間遠心した後、上清を除去した。この工程を 3 回繰り返した後、70%エタノールを完全に除去し RNA を風乾させた。RNA を Nuclease free water (NFW) 15 μ L で溶解し RNA 溶液とした。以上で得られた RNA 溶液の濃度を 260 nm の吸光度により定量し、NFW を用いて 2 μ g/10 μ L になるように調整した。

2-2-9. 逆転写 (RT) 反応

ReverTra-Ace qPCR-RT Mix (TOYOBO) を使用する本数 \times 0.5 μ L と等量の NFW を混合し、1.5 mL チューブに 1 μ L ずつ分注した後、2 μ L の調整した RNA 溶液をそれぞれ加え混合した。37°C で 30 分間インキュベートした後、98°C で 5 分間インキュベート後氷冷し、TE (pH 8.0) バッファー (NIPPON GENE) 22.5 μ L を添加し、cDNA サンプルとした。

2-2-10. リアルタイム PCR

1 サンプルあたり KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を 12.5 μ L、50 \times ROX reference dye を 0.05 μ L、Forward および Reverse プライマーをそれぞれ 0.5 μ L、MilliQ 水を 12.5 μ L を混和し、マスターミックスとした。検量線を得るために、サンプルを混和した検量線サンプルを作製し、1 倍、5 倍、25 倍、125 倍となるように TE (pH 8.0) バッファーで希釈した。0.6 mL チューブにマスターミックスを 24 μ L ずつ分注した後、1 μ L の cDNA サンプルを加え混和した。この混和液を 10 μ L ずつ、96 well PCR プレート (Sorenson BioScience, Inc) の上下 2 つの well に分注し、7500 Fast System (Applied Biosystems) で PCR を行った。反応条件は、最初に 95°C 5 分間で初期変性を行った後、95°C 10 秒 \rightarrow 55°C 20 秒 \rightarrow 72°C 30 秒で計 50 サイクル行った。データは、Applied Biosystems 7500 Fast System SDS ソフトウェアを用いて分析した。使用したプライマーを下記の表 11 に示す。内部標準として β -actin を用いて補正をおこなった。

表 11.

Gene	Forward	Reverse	bp
<i>CYP11B1</i>	GCTGCAGTGGCTGCTCCT	CCCACGACCTGATCCAATTCT	81
β -actin	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	88

2-3. 結果

2-3-1. AHR アゴニストによる細胞毒性の評価

用いた AHR アゴニストによる細胞毒性がないかを確認するために、MCF-7 細胞を接着細胞培養し、各アゴニストを 48 時間処置した際の細胞生存率を MTS assay により測定した。その結果、各アゴニストおよび今回用いた濃度 48 時間処置下において、細胞毒性は認められなかった (Fig. 19)。

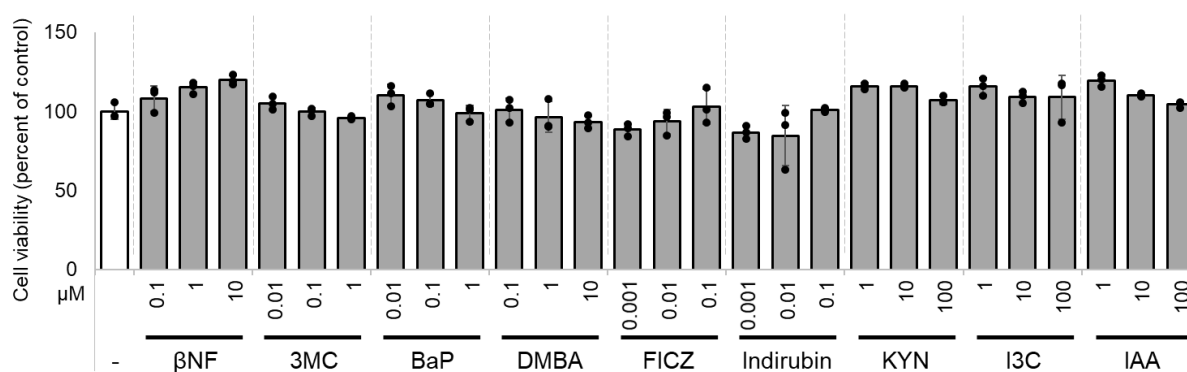


Fig. 19. AHR アゴニスト処置による細胞毒性

MCF-7 細胞を接着培養条件下において播種し、その翌日、示した濃度の AHR アゴニストまたは溶媒 (0.1% DMSO) を処置した。48 時間培養した後、細胞生存率を MTS assay によって測定した (mean + S.D., n = 3)。

2-3-2. AHR アゴニストによる腫瘍様塊形成への影響

2-3-1. で用いた AHR アゴニストによる腫瘍様塊形成への影響を MCF-7 細胞およびその AHR-KO 細胞を用いて評価した (Fig. 20)。当教室で以前に抑制作用を報告している βNF を 3 点の濃度で培養した結果、βNF 濃度依存的に腫瘍様塊の形成抑制作用が認められたが、AHR-KO 細胞ではその抑制作用が認められなかった。したがって、この腫瘍様塊形成抑制作用は AHR 依存的であることが確認された (Fig. 20A)。

残りの AHR アゴニスト 8 種についても同様の実験を行った結果、βNF 処置と比較して、3MC、BaP および DMBA 処置において顕著な腫瘍様塊の形成抑制作用が認められた。また、FICZ、indirubin、KYN においては、βNF 処置と比較すると腫瘍様塊形成抑制作用が弱く現れることが明らかとなった。これらの AHR アゴニストによる腫瘍様塊

形成抑制作用は AHR-KO 細胞では認められず、AHR 依存的な作用であることが確認された。その一方で I3C と IAA は、今回用いた最大濃度 100 μ M で 処置した場合、WT だけでなく、KO においても強い腫瘍様塊の形成抑制作用が認められた。

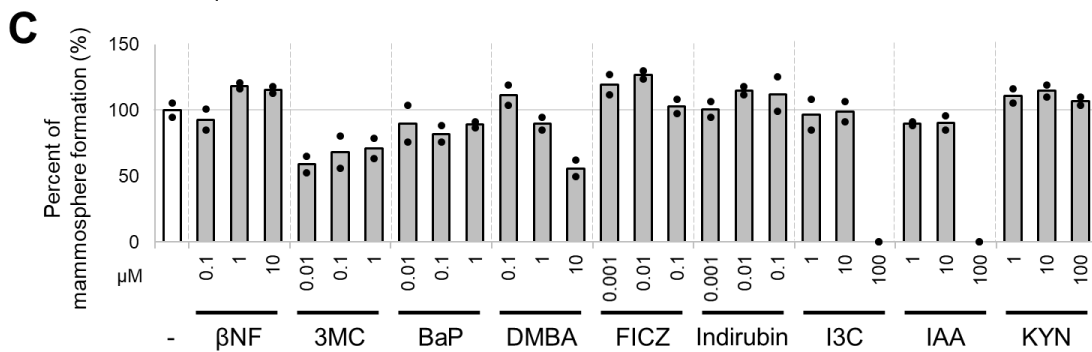
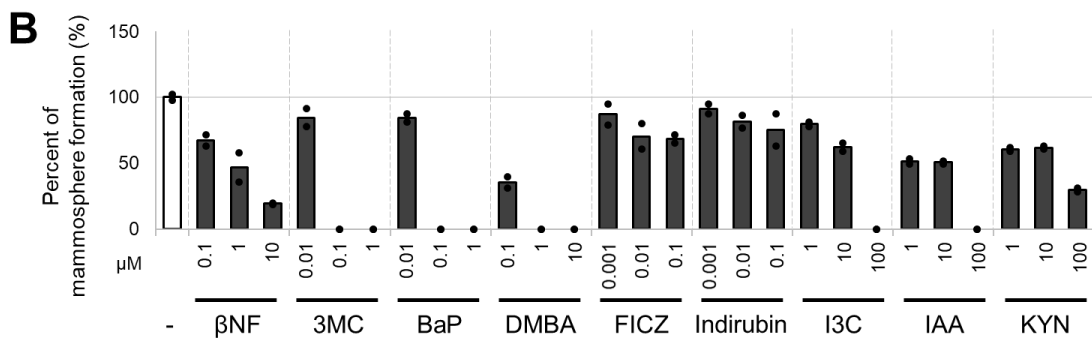
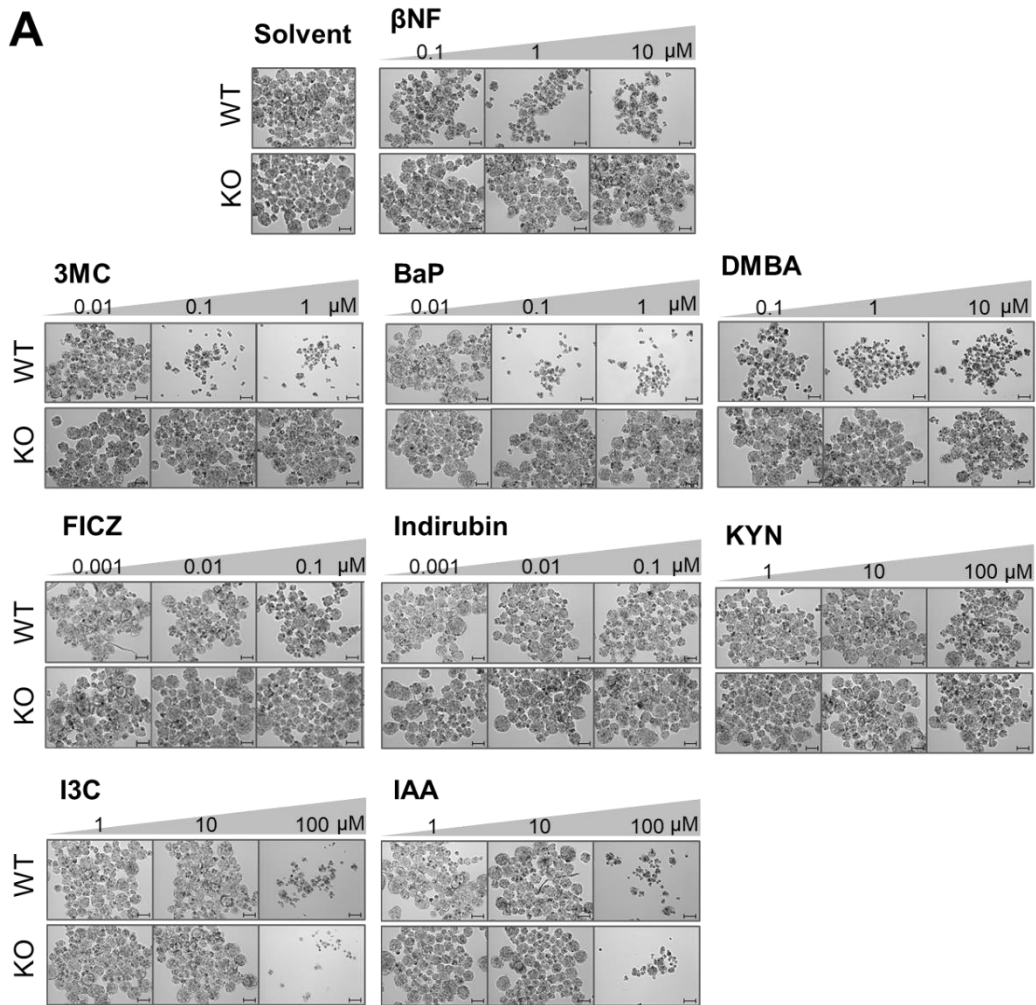


Fig. 20. AHR アゴニスト処置による腫瘍様塊形成抑制作用

野生型(wild-type; WT)および AHR-KO(KO)MCF-7 細胞を足場非依存性条件において、示した濃度の AHR アゴニストまたは溶媒(0.1% DMSO)存在下で播種し、5日間培養した。(A)形成された腫瘍様塊を倍率10倍の光学顕微鏡で観察した(scale bar: 100 μ m)。また、WT細胞(B)およびAHR-KO細胞(C)における腫瘍様塊形成数はカウントし、溶媒コントロールに対する形成率を示した(n=2)。

2-3-3. AHR アゴニストによる AHR を介した転写活性化作用の比較

各アゴニスト処置による AHR を介した転写活性化能を比較するために、AHR 応答配列 reporter assay を実施した (Fig. 21)。各アゴニストを 6 時間処置した結果、DMBA を除いて、各アゴニスト処置によるレポーター活性の上昇が認められた (Fig. 21A)。3MC、BaP、I3C、IAA、KYN においては、濃度依存的な活性上昇が認められ、FICZ および indirubin においては、低濃度処置下においても高いレポーター活性を示した。また、 β NF は luciferase 酵素活性の阻害作用を示すことが報告されており [84]、本実験においても測定不能であった (データは示していない)。

また、各アゴニストを 24 時間処置した結果、DMBA を除き、各アゴニスト濃度依存的にレポーター活性の上昇が認められた (Fig. 21B)。3MC、BaP および DMBA 処置においては、レポーター活性の誘導は持続または増加していた。その一方で、FICZ、indirubin、KYN、I3C、IAA においては、処置 24 時間後にかけて、レポーター活性の顕著な減弱が観察された。

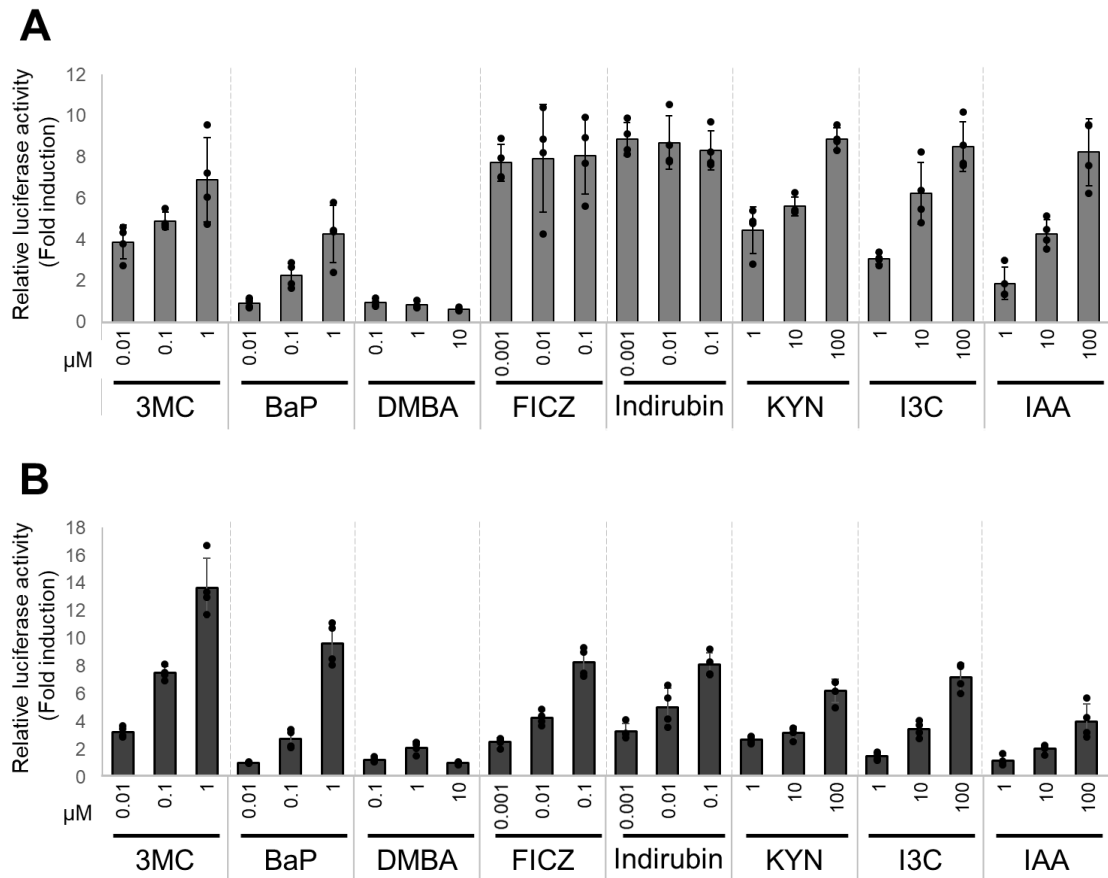


Fig. 21. AHR アゴニスト処置による AHR を介した転写活性化作用

MCF-7 細胞に XRE-luc reporter vector および pGL4.74 をトランスフェクションし、一晩インキュベートした。トランスフェクション後 48 時間の細胞回収にあわせて、溶媒 (0.1%DMSO) または示した濃度の AHR アゴニストを 6 時間 (A) または 24 時間 (B) 処置した。結果は、*Renilla* の値によって補正した後、溶媒コントロールに対する誘導倍率を示した (mean + S.D., n = 3)。

2-4. 考察

当教室では以前に、AHR アゴニストの一つである β NF 処置によって、ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 由来の腫瘍様塊形成が抑制されることを報告している[67,85]。本章は、AHR を標的とした治療応用化を目指す一環として、 β NF に加えて構造的に多様な既知 AHR アゴニストを用いることによって、本作用を選択的に発現するリガンドの存在を検証した。

初めに、本研究に用いた 9 種の AHR アゴニストが、ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 に対して細胞毒性を示すかを検討した。各 AHR アゴニストの処置濃度に関しては、これまでの報告に基づいて選択された薬剤濃度を用いて、当教室にて実施された XRE-reporter assay の用量依存性を検討した結果を参考にして設定した。その結果、各アゴニスト処置による細胞生存率への影響は認められず、細胞毒性を示さないことを確認した (Fig. 19)。

細胞毒性の認められなかった既知 AHR アゴニストを用いて、腫瘍様塊形成に対する抑制作用が AHR アゴニスト全般の特徴であるかを評価し、比較検討した。野生型 MCF-7 細胞を用いて mammosphere formation assay を行った結果、今回用いた 7 種のアゴニストにおいて AHR 依存的な腫瘍様塊形成抑制作用が認められ、特に 3MC、BaP、DMBA においては、低濃度処置下においても顕著な抑制作用が認められた (Fig. 20)。その一方で、FICZ、indirubin および KYN においては β NF と比較して弱い抑制作用が観察された。これらの結果より、抑制作用の強さはアゴニストによって異なることが示され、AHR の機能がリガンドによって制御可能であることが示唆された。しかしながら、I3C および IAA の最高濃度 (100 μ M) 処置下において、野生型 MCF-7 細胞だけではなく AHR-KO 細胞においても同等の顕著な形成抑制作用が認められた。これらの処置濃度は、接着培養条件下における毒性作用は認められなかったことより、足場非依存性培養条件下において AHR 依存的なものだけでなく、AHR 非依存的な抑制作用も有する可能性が考えられた。これらの現象の理解にはさらなる研究が必要であるが、このメカニズム解析で得られる情報は、AHR アゴニストに依存したマンモスフィア形成の抑制の機構的分析に役立つ可能性が考えられる。

次に、AHR の典型的な機能の一つの指標として、AHR を介した転写活性化作用に対する AHR アゴニストの影響を評価した (Fig. 21)。本研究では、AHR のコンセンサスな応答配列 (TTGCGTG) を組み込んだ reporter vector を用いて、一般的な AHR の転写

活性化能を検討することにした。各 AHR アゴニストを 6 時間処置した結果、DMBA を除く AHR アゴニストにおいて、レポーター活性の上昇が認められ、3MC、BaP、I3C、IAA、KYN においては、濃度依存的な活性上昇が認められた。その一方で、FICZ および indirubin においては、その他の AHR アゴニストと比較して低濃度に設定されているにも関わらず、低濃度処置下においても高いレポーター活性が認められたことより、FICZ および indirubin は AHR と高い結合親和性を示すことが推察された。実際に FICZ は、1 nM の TCDD を使用した競合結合アッセイにおいて、0.07 nM の推定解離定数 (Kd) を示すことが報告されている [86]。また FICZ は、AHR の標的遺伝子の一つである CYP1A1 の基質となることが報告されており、AHR を活性化させた後、速やかに代謝分解されることによって、AHR 活性を制御するフィードバックループが存在すると考えられている [87]。Indirubin においても同様な報告がされている。TCDD による CYP mRNA 誘導は 72 時間以上認められた一方で、indirubin においては最大の CYP 活性は TODD と同等であるにもかかわらず、3 時間で CYP mRNA 誘導のピークを示した。また、indirubin はヒト CYP1A1 または CYP1B1 を含むミクロソームによって代謝されることが報告されている [88]。本研究においても、FICZ および indirubin 処置した 24 時間後において、6 時間後と比較して高濃度処置下では同等の強いレポーター活性を示したが、低濃度処置下においてはレポーター活性の大幅な減弱が認められ、一時的な AHR の転写活性化作用を示す AHR アゴニストである可能性が示された。また対照的に、3MC および BaP においては、処置後 6 時間から 24 時間にかけて、レポーター活性の維持または増強が認められ、FICZ や indirubin と比較して持続的な AHR の転写活性化作用を示す AHR アゴニストである可能性が考えられた。

本章において評価した 2 つの AHR の作用、腫瘍様塊形成抑制作用および AHR を介した転写活性化作用について、各 AHR アゴニストによる効果を比較した結果、それぞれの作用は必ずしも相関しないことが明らかとなった。3MC や BaP は、顕著な腫瘍様塊形成抑制作用および転写活性化作用を示したが、FICZ や indirubin においては、3MC に匹敵するほどのレポーター活性を誘導した一方で、3MC と比較して腫瘍様塊形成に対してはるかに弱い抑制作用効果を示した。また DMBA においては、転写活性化作用がほとんど認められなかったにも関わらず、顕著な腫瘍様塊形成抑制作用を示し、FICZ や indirubin とは逆のパターンを示した。KYN においては、腫瘍様塊形成抑制作用および転写活性化作用は他の AHR アゴニストと比較して弱く表れることが示された。これらの結果より、AHR の 2 つの異なる機能である腫瘍様塊形成抑制作用および AHR を介

した転写活性化作用は、AHR アゴニストのタイプに応じて独立して誘導されることが示唆され、AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を選択的に発現するリガンドが存在する可能性を示すことができた。

AHR 機能の誘導におけるアゴニスト依存的な相違を示す要因の一つとして、AHR 活性化の持続性が考えられた。持続的な AHR の転写活性化作用を示した 3MC、BaP、DMBA は、腫瘍様塊形成を強く抑制し、対照的に処置後 24 時間時点で転写活性化作用の減弱が認められた FICZ、indirubin、I3C、IAA および KYN においてははるかに弱い形成抑制作用を示した。したがって、 β NF は前者のグループに分類される可能性が考えられる。本研究で用いた mammosphere formation assay では、細胞をアゴニストと共に 5 日間培養したことを考慮すると、これらの結果は、腫瘍様塊形成過程における AHR 活性化の持続が、AHR アゴニストによる腫瘍様塊形成の阻害に重要である可能性が考えられた。

また、顕著な腫瘍様塊形成抑制作用を示した 3MC、BaP、DMBA は、CYP1A1 や CYP1B1 によって代謝的に活性化される発がん性多環芳香族炭化水素として知られており、DNA 付加体形成や酸化 DNA 損傷を誘発する可能性が報告されている [89,90]。さらに、BaP は MCF-7 細胞で p53 の活性化、細胞周期の停止、細胞死を誘導する [91]。また、活性酸素種による酸化ストレスは、MCF-7 細胞の腫瘍様塊形成の抑制に関与していることも報告されている [92]。したがって、これらの AHR アゴニストはその化合物の特性に関与している可能性が考えられた。AHR アゴニストを介した腫瘍様塊形成の抑制は不明な点が残されており、さまざまなタイプの AHR 機能に対するアゴニストの選択性を理解するためにはさらなる研究が必要である。

本章の結果より、核内受容体とは異なる受容体型転写因子の AHR の場合においても、機能や遺伝子を選択的に発現調節可能なリガンドが存在する可能性を示すことができた。本研究では、化合物の特性上、治療応用化に適した AHR アゴニストを同定することはできなかったが、乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を含む多岐にわたる AHR の機能およびそのメカニズムを理解することによって、より理想的な AHR の選択的機能調節薬の発見が可能となり、AHR ががんの新たな治療標的となることが期待される。

総括

本研究では、「乳がんにおける選択的機能調節薬を同定し、受容体型転写因子を標的とした新たな創薬基盤を確立する」ことを目的とし、新たなリガンドの探索を行った。受容体型転写因子である核内受容体は、そのリガンドとなる低分子化合物による活性制御を受けて様々な生理機能調節を担い、内分泌疾患や代謝疾患、がんなど様々な疾病の治療薬の創薬ターゲットになっている。核内受容体リガンドの中でも、SNRM は、核内受容体の機能または遺伝子発現制御を組織選択的に発揮する特徴を持ち、臨床応用もされている。また当教室では、選択的な作用発現の新たな分子機序として、組織選択性だけでなく同一組織内において核内受容体の複数の機能や遺伝子を選択して発現する核内受容体リガンドを複数報告している。一般的に核内受容体は、典型的なアゴニストによって活性化されると様々な機能を一律に発現し、状況によっては一部が不利益な機能として現れてしまうことが問題となるが、当教室の提案している「選択的機能調節薬」を用いれば、意図的に核内受容体の機能をコントロールすることができ、より効果的かつリスクの少ない治療薬としての応用が可能であると考えられる。第1章では、これらの基礎知見をもとに、ER α 陽性乳がん組織において ER α の有益な機能を選択的に発現するリガンドのシードとなる候補化合物の探索を実施した。その結果、ER α 陽性乳がんの治療効果として、エストロゲン依存的細胞増殖抑制作用を示し、ER α の有益な機能を発揮する適度な活性を保持した部分アゴニスト候補化合物として、10-dehydroxyglycyuralin E (T9) を同定することができた。T9 は、ER α のフルアゴニストである E2 と比較して 30%ほどの活性を残しており、また、E2 によって促進された乳がん細胞増殖の抑制作用を示した。以上の結果より、核内受容体の分子機構を基盤としたスクリーニング法の構築により、乳がん組織において ER α の有益な機能を選択的に発現するリガンドのシード化合物を探索することができた。これらの方法で見出された候補化合物を用いて、有益な機能が実際に認められるかを証明することによって、より優れた乳がん治療薬の開発につながることを期待される。

また第2章では、核内受容体とは構造の異なる受容体型転写因子 AHR に着目し、AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を選択的に発現するリガンドが存在する可能性を示した。AHR は元来、ダイオキシン類の毒性を仲介するタンパク質として同定され、様々な毒性学的観点から研究されてきたが、近年では、抗炎症作用や抗腫瘍作用があることが報告され [54,55]、当教室においても、AHR アゴニストである

β NF が乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成を抑制することを見出し [67]、AHR が乳がんの根治療法として有用な治療標的となる可能性を提示している。そこで本章では、この AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用の治療応用化を目指す一環として、本研究の基盤となる核内受容体に対する「選択的機能調節薬の概念」を構造が異なる AHR に置き換え、AHR による本抑制作用を選択的に発現するリガンドが存在すると仮定し、既知 AHR アゴニスト 9 種を用いてその可能性を検討した。複数の AHR アゴニストを評価および比較した結果、乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用の強さがアゴニストによって異なるが明らかとなり、AHR の一つの機能をリガンドによって調節可能であることが示唆された。さらに、この抑制作用の強さは、AHR の典型的な機能の 1 つである転写活性化作用と必ずしも相関しないことが明らかとなり、AHR の 2 つの異なる機能はアゴニストのタイプに応じて独立して誘導されることが示唆され、AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を選択的に発現するリガンドが存在する可能性が示された。

以上のように、本研究では、乳がんにおける $ER\alpha$ の選択的機能調節薬のリード化合物の探索、および AHR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を選択的に発現するリガンドが存在する可能性を示すことができた。今後、この選択的機能調節薬の作用概念をもとに、選択的機能調節薬の同定およびその分子メカニズムの理解を基盤とした新たな乳がん治療薬の開発に貢献されることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました本学薬学部 公衆衛生学教室 教授 根本清光先生に心より感謝申し上げます。

本論文を御精読ならびに貴重な御助言を賜りました、本学薬学部 衛生化学教室 教授 山本千夏先生、分子生物学教室 教授 多田周右先生、薬物動態学教室 教授 宮内正二先生に心より感謝申し上げます。

また、学部在籍時より、直接のご指導、ならびに数々の御助言を賜りました静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野 講師 菅野裕一郎先生に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究に関して、数々の御助言を賜りました本学薬学部 名誉教授（前公衆衛生学教室 教授）井上義雄先生、ならびに本学薬学部 客員教授（静岡県立大学 名誉教授）出川雅邦先生、静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野 教授 吉成浩一先生に心より感謝申し上げます。

本研究の化合物ライブラリーを提供して頂いた本学部 生薬学教室 教授 小池一男先生、准教授 李巍先生、ならびに瀋陽薬科大学の先生方に心より感謝申し上げます。

また、適切な御助言を頂きました本学薬学部 公衆衛生学教室 講師 竹元裕明先生、助教 粕谷ひかる先生、中濱隆之先生（前公衆衛生学教室 講師）、静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野 助教 保坂卓臣先生、助教 志津怜太先生に感謝申し上げます。そして、これまで切磋琢磨してきた公衆衛生学教室の大学院生、学部生の皆様に心より感謝いたします。

本研究は、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金（N-191502）、東京生化学研究会奨学補助金のご支援により遂行されました。この場をお借りして、心より感謝申し上げます。

最後になりますが、公衆衛生学教室の益々のご盛栄と皆様のご健勝を祈念いたします。

参考文献

- [1] H. Gronemeyer, J.Å. Gustafsson, V. Laudet, Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 950–964.
<https://doi.org/10.1038/nrd1551>.
- [2] M.A. Lazar, Maturing of the nuclear receptor family, *J. Clin. Invest.* 127 (2017) 1123–1125. <https://doi.org/10.1172/JCI92949>.
- [3] K. Bosscher, S.J. Desmet, D. Clarisse, E. Estébanez-perpiña, L. Brunsveld, Nuclear receptor crosstalk — defining the mechanisms for therapeutic innovation, *Nat. Rev. Endocrinol.* (n.d.). <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0349-5>.
- [4] K. Mohideen-Abdul, K. Tazibt, M. Bourguet, I. Hazemann, I. Lebars, M. Takacs, S. Cianférani, B.P. Klaholz, D. Moras, I.M.L. Billas, Importance of the Sequence-Directed DNA Shape for Specific Binding Site Recognition by the Estrogen-Related Receptor., *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8 (2017) 140. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00140>.
- [5] F. Rastinejad, P. Huang, V. Chandra, S. Khorasanizadeh, Understanding nuclear receptor form and function using structural biology., *J. Mol. Endocrinol.* 51 (2013) T1–T21.
<https://doi.org/10.1530/JME-13-0173>.
- [6] C. Helsen, S. Kerkhofs, L. Clinckemalie, L. Spans, M. Laurent, S. Boonen, D. Vanderschueren, F. Claessens, Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding, *Mol. Cell. Endocrinol.* 348 (2012) 411–417.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.025>.
- [7] L. To, Closely Related But Distinct, (1987) 4–6.
- [8] J.L. Fribourgh, C.L. Partch, Assembly and function of bHLH-PAS complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 5330–5332.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705408114>.
- [9] K.W. Schulte, E. Green, A. Wilz, M. Platten, O. Daumke, Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation, *Structure*. 25 (2017) 1025-1033.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2017.05.008>.
- [10] A. Tkachenko, F. Henkler, J. Brinkmann, J. Sowada, D. Genkinger, C. Kern, T. Tralau, A. Luch, The Q-rich / PST domain of the AHR regulates both ligand- induced nuclear transport and nucleocytoplasmic shuttling, *Nat. Publ. Gr.* (2016) 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep32009>.
- [11] M.S. Denison, S.R. Nagy, Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43 (2003) 309–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>.
- [12] Q. Ma, J.P. Whitlock, A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor,

- contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 8878–8884.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.8878>.
- [13] O. Hankinson, The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon receptor action, *Trends Endocrinol. Metab.* 5 (1994) 240–244.
[https://doi.org/10.1016/1043-2760\(94\)P3082-I](https://doi.org/10.1016/1043-2760(94)P3082-I).
- [14] J.P. Whitlock, Mechanistic Aspects of Dioxin Action, *Chem. Res. Toxicol.* 6 (1993) 754–763. <https://doi.org/10.1021/tx00036a003>.
- [15] J.P.W. Jr., S.T. Okino, U. Dong, H.P. Ko, R. Clarke-Katzenberg, Q. Ma, H. Li, Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription, *FASEB J.* 10 (1996) 809–818.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.10.8.8666157>.
- [16] R. Santos, O. Ursu, A. Gaulton, A.P. Bento, R.S. Donadi, C.G. Bologa, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T.I. Oprea, J.P. Overington, A comprehensive map of molecular drug targets., *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 19–34.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>.
- [17] D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R.M. Evans, The nuclear receptor superfamily: the second decade., *Cell.* 83 (1995) 835–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521507>.
- [18] S. Green, P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.M. Bornert, P. Argos, P. Chambon, Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A, *Nature.* 320 (1986) 134–139. <https://doi.org/10.1038/320134a0>.
- [19] S. Martinkovich, D. Shah, S.L. Planey, J.A. Arnott, Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility, *Clin. Interv. Aging.* 9 (2014) 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>.
- [20] Y. Shang, M. Brown, Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs., *Science.* 295 (2002) 2465–8. <https://doi.org/10.1126/science.1068537>.
- [21] Y. Shang, M. Brown, Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs, *Science (80-.).* 295 (2002) 2465–2468. <https://doi.org/10.1126/science.1068537>.
- [22] Y. Kanno, R. Hikosaka, S.-Y. Zhang, Y. Inoue, T. Nakahama, K. Kato, A. Yamaguchi, N. Tominaga, S. Kohra, K. Arizono, Y. Inouye, (17 α ,20E)-17,20-[(1-methoxyethylidene)bis(oxy)]-3-oxo-19-norpregna-4,20-diene-21-carboxylic acid methyl ester (YK11) is a partial agonist of the androgen receptor., *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 318–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372378>.

- [23] S. Zhao, Y. Kanno, W. Li, H. Wakatabi, T. Sasaki, K. Koike, K. Nemoto, H. Li, Picrasidine N Is a Subtype-Selective PPAR β/δ Agonist, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 879–885. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00909>.
- [24] S. Nilsson, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptors: Therapies targeted to receptor subtypes, *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (2011) 44–55. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.226>.
- [25] P. Pace, J. Taylor, S. Suntharalingam, R.C. Coombes, S. Ali, Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25832–25838. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25832>.
- [26] G.G.J.M. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J.Å. Gustafsson, Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 5925–5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>.
- [27] A.M. Kaunitz, J.E. Manson, Manejo dos Sintomas da Menopausa, *Obstet. Gynecol.* 126 (2016) 859–876. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001058>.Management.
- [28] E. V. Jensen, V.C. Jordan, The estrogen receptor: A model for molecular medicine, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1980–1989.
- [29] P. Vercellini, P. Viganò, E. Somigliana, L. Fedele, Endometriosis: Pathogenesis and treatment, *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>.
- [30] G.P. Flake, J. Andersen, D. Dixon, Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review., *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 1037–54. <https://doi.org/10.1289/ehp.5787>.
- [31] N.M. Petersen, A.L. Briggs, Selective estrogen receptor modulators, *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 3 (2005) 19–30. <https://doi.org/10.1385/bmm:3:1:019>.
- [32] V.C. Jordan, Tamoxifen: Catalyst for the change to targeted therapy, *Eur. J. Cancer.* 44 (2008) 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.11.002>.
- [33] J. Cuzick, I. Sestak, B. Bonanni, J.P. Costantino, S. Cummings, A. DeCensi, M. Dowsett, J.F. Forbes, L. Ford, A.Z. LaCroix, J. Mershon, B.H. Mitlak, T. Powles, U. Veronesi, V. Vogel, D.L. Wickerham, SERM Chemoprevention of Breast Cancer Overview Group, Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data., *Lancet (London, England)*. 381 (2013) 1827–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60140-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60140-3).
- [34] C. Jochems, U. Islander, A. Kalkkopf, M. Lagerquist, C. Ohlsson, H. Carlsten, Role of raloxifene as a potent inhibitor of experimental postmenopausal polyarthritis and osteoporosis, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 3261–3270. <https://doi.org/10.1002/art.22873>.
- [35] T.N. England, Effects of Raloxifene on Bone Mineral Density , Serum Cholesterol

- Women, *Medicine (Baltimore)*. 337 (1997) 1641–1647.
- [36] R.A. Lobo, J.A. V. Pinkerton, M.L.S. Gass, M.H. Dorin, S. Ronkin, J.H. Pickar, G. Constantine, Evaluation of bazedoxifene/conjugated estrogens for the treatment of menopausal symptoms and effects on metabolic parameters and overall safety profile, *Fertil. Steril.* 92 (2009) 1025–1038. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.113>.
- [37] B.S. Komm, Y.P. Kharode, P.V.N. Bodine, H.A. Harris, C.P. Miller, C.R. Lyttle, Bazedoxifene acetate: A selective estrogen receptor modulator with improved selectivity, *Endocrinology*. 146 (2005) 3999–4008. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0030>.
- [38] H.B. Nichols, L.A. DeRoo, D.R. Scharf, D.P. Sandler, Risk-benefit profiles of women using tamoxifen for chemoprevention., *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015) 354. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju354>.
- [39] J.M. Drazen, G.D. Curfman, Retraction: Barbaro et Al. Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV-positive patients. *N Engl J Med* 1998;339:1093-9., *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 140. <https://doi.org/10.1056/NEJM200207113470213>.
- [40] A. Schmidt, D.B. Kimmel, C. Bai, A. Scafonas, S.J. Rutledge, R.L. Vogel, S. McElwee-Witmer, F. Chen, P. V. Nantermet, V. Kasparcova, C.T. Leu, H.Z. Zhang, M.E. Duggan, M.A. Gentile, P. Hodor, B. Pennypacker, P. Masarachia, E.E. Opas, S.A. Adamski, T.E. Cusick, J. Wang, H.J. Mitchell, Y. Kim, T. Prueksaritanont, J.J. Perkins, R.S. Meissner, G.D. Hartman, L.P. Freedman, S.I. Harada, W.J. Ray, Discovery of the selective androgen receptor modulator MK-0773 using a rational development strategy based on differential transcriptional requirements for androgenic anabolism versus reproductive physiology, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 17054–17064. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099002>.
- [41] Y. Kanno, Y. Takane, Y. Takizawa, Y. Inouye, Suppressive effect of aryl hydrocarbon receptor repressor on transcriptional activity of estrogen receptor alpha by protein–protein interaction in stably and transiently expressing cell lines, *Mol. Cell. Endocrinol.* 291 (2008) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.05.004>.
- [42] Y. Tang, C. Jiang, X. Zhang, C. Liu, J. Lin, Y. Wang, C. Du, X. Peng, W. Li, Y. Liu, M. Cheng, Collective Syntheses of 2-(3-Methylbenzofuran-2-yl)phenol-Derived Natural Products by a Cascade [3,3]-Sigmatropic Rearrangement/Aromatization Strategy, *J. Org. Chem.* 82 (2017) 11102–11109. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02066>.
- [43] H. Mohammed, C. D’Santos, A.A. Serandour, H.R. Ali, G.D. Brown, A. Atkins, O.M. Rueda, K.A. Holmes, V. Theodorou, J.L.L. Robinson, W. Zwart, A. Saadi, C.S. Ross-

- Innes, S.F. Chin, S. Menon, J. Stingl, C. Palmieri, C. Caldas, J.S. Carroll, Endogenous Purification Reveals GREB1 as a Key Estrogen Receptor Regulatory Factor, *Cell Rep.* 3 (2013) 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.010>.
- [44] M.G. Ghosh, D.A. Thompson, R.J. Weigel, PDZK1 and GREB1 are estrogen-regulated genes expressed in hormone-responsive breast cancer, *Cancer Res.* 60 (2000) 6367–6375.
- [45] E. Leygue, H. Dotzlaw, P.H. Watson, L.C. Murphy, Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis, *Cancer Res.* 58 (1998) 3197–3201.
- [46] A. Poland, E. Glover, A.S. Kende, Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase., *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 4936–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/956169>.
- [47] A. Poland, J.C. Knutson, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22 (1982) 517–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.002505>.
- [48] F.J. Gonzalez, P. Fernandez-Salguero, The aryl hydrocarbon receptor. Studies using the AHR-null mice, *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 1194–1198.
- [49] C.A. Opitz, U.M. Litztenburger, F. Sahm, M. Ott, I. Tritschler, S. Trump, T. Schumacher, L. Jestaedt, D. Schrenk, M. Weller, M. Jugold, G.J. Guillemin, C.L. Miller, C. Lutz, B. Radlwimmer, I. Lehmann, A. Von Deimling, W. Wick, M. Platten, An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor, *Nature.* 478 (2011) 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>.
- [50] E. Fritsche, C. Schäfer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hübenthal, J.E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, L.O. Klotz, A. Rannug, P. Fürst, H. Hanenberg, J. Abel, J. Krutmann, Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 8851–8856. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701764104>.
- [51] J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C.A. Miller, T. Kato, K. Saeki, T. Matsuda, Indirubin and Indigo are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31475–31478. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100238200>.
- [52] C.J. Sinal, J.R. Bend, Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of Cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells, *Mol. Pharmacol.* 52 (1997) 590–599.

- <https://doi.org/10.1124/mol.52.4.590>.
- [53] T.D. Hubbard, I.A. Murray, G.H. Perdew, Special section on drug metabolism and the microbiome - Minireview indole and tryptophan metabolism: Endogenous and dietary routes to ah receptor activation, *Drug Metab. Dispos.* 43 (2015) 1522–1535.
<https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246>.
- [54] P.B. Busbee, L. Menzel, H.R. Alrafas, N. Dopkins, W. Becker, K. Miranda, C. Tang, S. Chatterjee, U.P. Singh, M. Nagarkatti, P.S. Nagarkatti, Indole-3-carbinol prevents colitis and associated microbial dysbiosis in an IL-22–dependent manner, *JCI Insight.* 5 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127551>.
- [55] S. Kawai, H. Iijima, S. Shinzaki, S. Hiyama, T. Yamaguchi, M. Araki, S. Iwatani, E. Shiraishi, A. Mukai, T. Inoue, Y. Hayashi, M. Tsujii, D. Motooka, S. Nakamura, T. Iida, T. Takehara, Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation, *J. Gastroenterol.* 52 (2017) 904–919.
<https://doi.org/10.1007/s00535-016-1292-z>.
- [56] J.E. Dick, D. Bonnet, Human Acute Myeloid Leukaemia is organised as a heirarchy that originates from a primitive haematopoetic cell., *Nat. Med.* 3 (1997) 730–737.
<http://www.nature.com/naturemedicine>.
- [57] M. Baumann, M. Krause, R. Hill, Clonogens and cancer stem cells, *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 990. <https://doi.org/10.1038/nrc2419-c2>.
- [58] M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, M.F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.
- [59] D. Ponti, A. Costa, N. Zaffaroni, G. Pratesi, G. Petrangolini, D. Coradini, S. Pilotti, M.A. Pierotti, M.G. Daidone, Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, *Cancer Res.* 65 (2005) 5506–5511.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>.
- [60] E.C. Kordon, G.H. Smith, An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell, *Development.* 125 (1998) 1921–1930.
- [61] M. Kakarala, M.S. Wicha, Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 2813–2820.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3931>.
- [62] B.A. Reynolds, S. Weiss, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, *Science (80-.).* 255 (1992) 1707–1710.
<https://doi.org/10.1126/science.1553558>.
- [63] G. Dontu, M. Al-Hajj, W.M. Abdallah, M.F. Clarke, M.S. Wicha, Stem cells in normal

- breast development and breast cancer, *Cell Proliferation*, Suppl. 36 (2003) 59–72.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x>.
- [64] F.L. Shaw, H. Harrison, K. Spence, M.P. Ablett, B.M. Simões, G. Farnie, R.B. Clarke, A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 17 (2012) 111–117. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9255-3>.
- [65] G. Farnie, R.B. Clarke, K. Spence, N. Pinnock, K. Brennan, N.G. Anderson, N.J. Bundred, Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: Role of notch and epidermal growth Factor Receptor Signaling Pathways, *J. Natl. Cancer Inst.* 99 (2007) 616–627. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk133>.
- [66] H. Harrison, G. Farnie, S.J. Howell, R.E. Rock, S. Stylianou, K.R. Brennan, N.J. Bundred, R.B. Clarke, Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor, *Cancer Res.* 70 (2010) 709–718.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1681>.
- [67] S. Zhao, Y. Kanno, M. Nakayama, M. Makimura, S. Ohara, Y. Inouye, Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells, *Cancer Lett.* 317 (2012) 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.025>.
- [68] M. Daujat, S. Charrasse, I. Fabre, P. Lesca, Y. Jounaïdi, C. Larroque, L. Poellinger, P. Maurel, Induction of CYP1A1 gene by benzimidazole derivatives during Caco-2 cell differentiation: Evidence for an aryl-hydrocarbon receptor-mediated mechanism, *Eur. J. Biochem.* 237 (1996) 642–652. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0642p.x>.
- [69] A. Tkachenko, M. Bermudez, S. Irmer-Stooff, D. Genkinger, F. Henkler-Stephani, G. Wolber, A. Luch, Nuclear transport of the human aryl hydrocarbon receptor and subsequent gene induction relies on its residue histidine 291, *Arch. Toxicol.* 92 (2018) 1151–1160. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2129-0>.
- [70] A.B. Okey, L.M. Vella, Binding of 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to a common Ah receptor site in mouse and rat hepatic cytosols., *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06834.x>.
- [71] Y. Shimizu, Y. Nakatsuru, M. Ichinose, Y. Takahashi, H. Kume, J. Mimura, Y. Fujii-Kuriyama, T. Ishikawa, Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 779–82.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.779>.
- [72] T.Y. Wong, S.M. Lin, C.H. Poon, L.K. Leung, The licorice flavonoid isoliquiritigenin reduces DNA-binding activity of AhR in MCF-7 cells, *Chem. Biol. Interact.* 221 (2014)

- 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.07.015>.
- [73] U. Rannug, A. Rannug, U. Sjöberg, H. Li, R. Westerholm, J. Bergman, Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands., *Chem. Biol.* 2 (1995) 841–5. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90090-x](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90090-x).
- [74] A. Rannug, U. Rannug, The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation., *Crit. Rev. Toxicol.* 48 (2018) 555–574. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1493086>.
- [75] J. Procházková, A. Kozubík, M. Machala, J. Vondráček, Differential effects of indirubin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signalling in liver progenitor cells, *Toxicology.* 279 (2011) 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.10.003>.
- [76] J.D. Mezrich, J.H. Fechner, X. Zhang, B.P. Johnson, W.J. Burlingham, C.A. Bradfield, An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells., *J. Immunol.* 185 (2010) 3190–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>.
- [77] S.-H. Seok, Z.-X. Ma, J.B. Feltenberger, H. Chen, H. Chen, C. Scarlett, Z. Lin, K.A. Satyshur, M. Cortopassi, C.R. Jefcoate, Y. Ge, W. Tang, C.A. Bradfield, Y. Xing, Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR)., *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 1994–2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000631>.
- [78] B.W. Megna, P.R. Carney, M. Nukaya, P. Geiger, G.D. Kennedy, ScienceDirect Indole-3-carbinol induces tumor cell death : function follows form, *J. Surg. Res.* 204 (2016) 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.04.021>.
- [79] L.F. Bjeldanes, J.Y. Kim, K.R. Grose, J.C. Bartholomew, C.A. Bradfield, Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 9543–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9543>.
- [80] S. Heath-Pagliuso, W.J. Rogers, K. Tullis, S.D. Seidel, P.H. Cuijn, A. Brouwer, M.S. Denison, Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites., *Biochemistry.* 37 (1998) 11508–15. <https://doi.org/10.1021/bi980087p>.
- [81] S.W. Kim, A. Goossens, C. Libert, F. Van Immerseel, J. Staal, R. Beyaert, Phytohormones: Multifunctional nutraceuticals against metabolic syndrome and comorbid diseases., *Biochem. Pharmacol.* 175 (2020) 113866. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113866>.
- [82] T.G. Montague, J.M. Cruz, J.A. Gagnon, G.M. Church, E. Valen, CHOPCHOP : a

- CRISPR / Cas9 and TALEN web tool for genome editing, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 401–407. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>.
- [83] A. Uesugi, T. Nakahama, S. Shimba, M. Tezuka, Y. Inouye, Possible involvement of chlorinated ethylenes in arylhydrocarbon receptor-related induction of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) in human hepatoma HepG2 cells, *J. Heal. Sci.* 50 (2004) 226–234. <https://doi.org/10.1248/jhs.50.226>.
- [84] T.T.Y. Wang, B-Naphthoflavone, an Inducer of Xenobiotic Metabolizing Enzymes, Inhibits Firefly Luciferase Activity, *Anal. Biochem.* 304 (2002) 122–126. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5562>.
- [85] S. Zhao, S. Ohara, Y. Kanno, Y. Midorikawa, M. Nakayama, M. Makimura, Y. Park, Y. Inouye, HER2 overexpression-mediated inflammatory signaling enhances mammosphere formation through up-regulation of aryl hydrocarbon receptor transcription, *Cancer Lett.* 330 (2013) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.021>.
- [86] A. Rannug, U. Rannug, H.S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, A.K. Grafstrom, Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances, *J. Biol. Chem.* 262 (1987). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47743-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47743-5).
- [87] Y.D. Wei, L. Bergander, U. Rannug, A. Rannug, Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, *Arch. Biochem. Biophys.* 383 (2000) 99–107. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2037>.
- [88] B.C. Spink, M.M. Hussain, B.H. Katz, L. Eisele, D.C. Spink, Transient induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 human breast cancer cells by indirubin, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 2313–2321. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.019>.
- [89] B. Ewa, M.Š. Danuta, Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts, *J. Appl. Genet.* 58 (2017) 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>.
- [90] T. Shimada, F.P. Guengerich, Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons., *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 288–94. <https://doi.org/10.1021/tx050291v>.
- [91] M. Pliskova, Dereglulation of Cell Proliferation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells Reflects Both Genotoxic and Nongenotoxic Events, *Toxicol. Sci.* 83 (2004) 246–256. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi040>.
- [92] G. Zhong, S. Qin, D. Townsend, B.A. Schulte, K.D. Tew, G.Y. Wang, Oxidative stress induces senescence in breast cancer stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514 (2019) 1204–1209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.098>.

Supplemental data

第 1 章

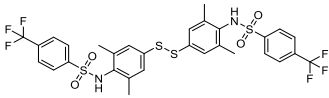
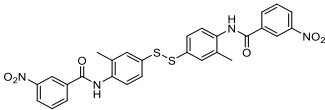
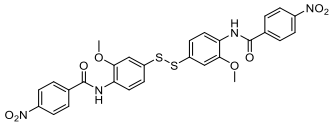
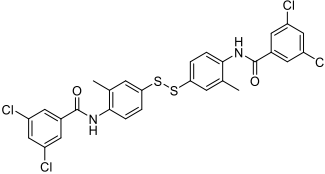
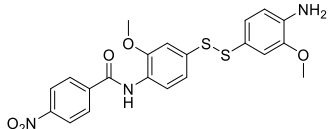
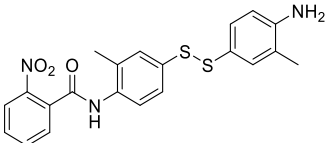
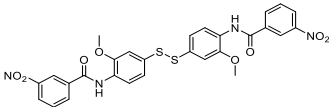
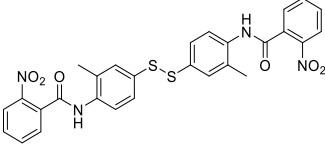
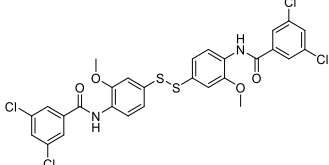
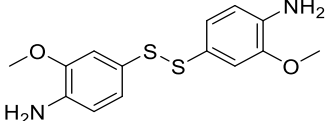
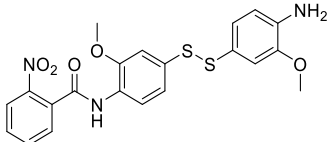
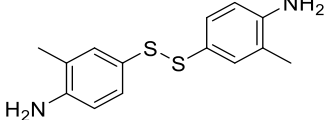
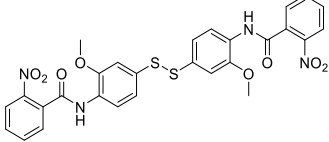
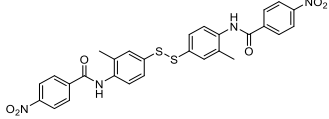
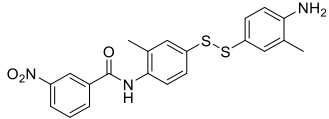
選択的エストロゲン受容体 α 部分アゴニスト 10-dehydroxyglycyuralin E (**T9**) の同定

1-1. 使用化合物

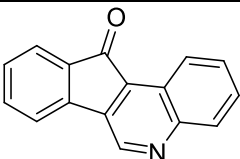
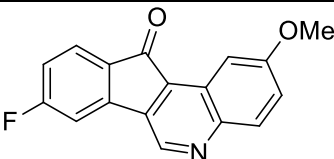
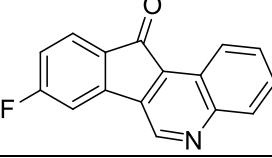
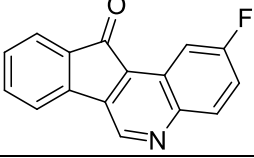
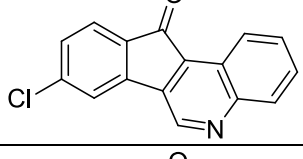
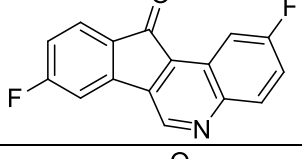
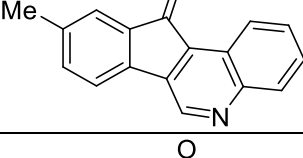
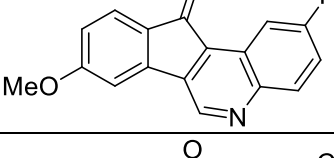
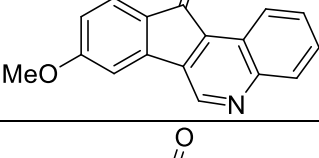
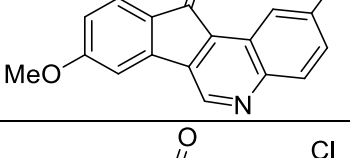
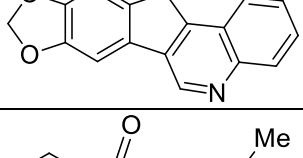
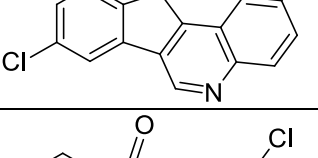
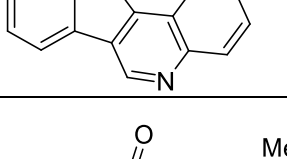
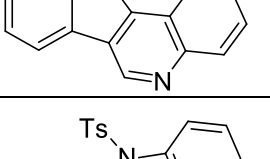
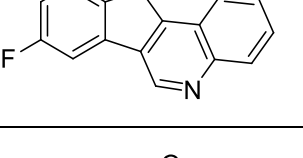
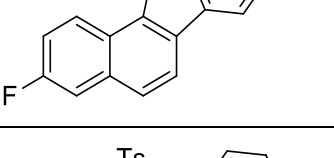
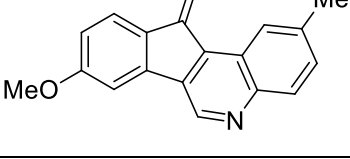
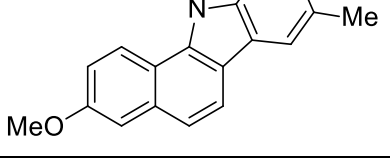
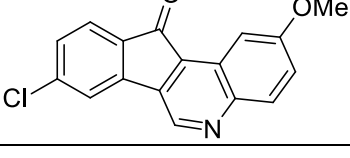
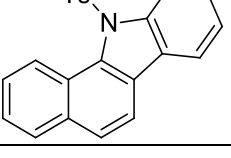
東邦大学薬学部生薬学教室より提供頂いた化合物ライブラリーの化学構造式の一覧を表 1S に示す。

表 1S 用いた化合物ライブラリーの化学構造式 (299 種)

No	Structure	No	Structure
IX1		IF3	
IX2		JX1	
IX5 (shang)		JX2	
IX5 (xia)		JX5 (shang)	
IX6		JX5 (xia)	
IF1 (shang)		JX6	
IF1 (xia)		JF1	
IF2 (shang)		JF2	
IF2 (xia)		JF3 (shang)	

No	Structure	No	Structure
JF3 (xia)		NX2I	
MX1 (shang)		NX5	
MX1 (xia)		NX6 (shang)	
MX2		NX6 (xia)	
MX5		M2	
MX6 (shang)		N2	
MX6 (xia)			
NX1s			
NX2s			

No	Structure	No	Structure
CLF-1		CLF-7	
CLF-2		CLF-8	
CLF-3		CLF-9	
CLF-4		CLF-10	
CLF-5			
CLF-6			

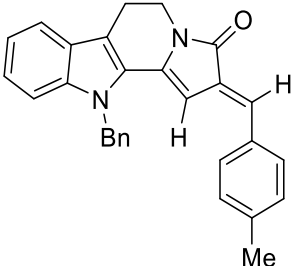
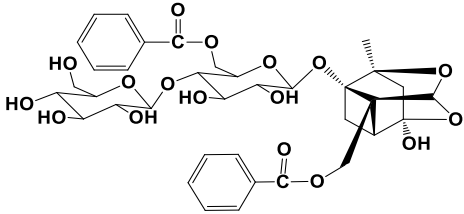
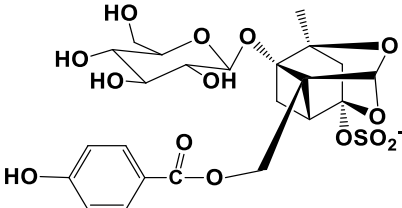
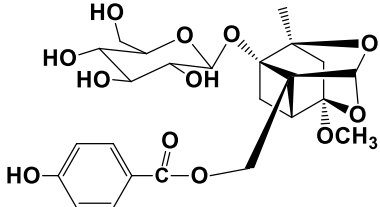
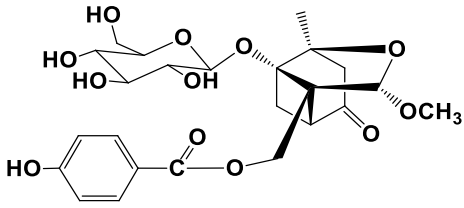
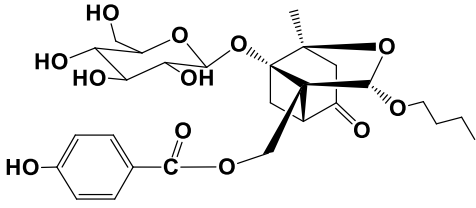
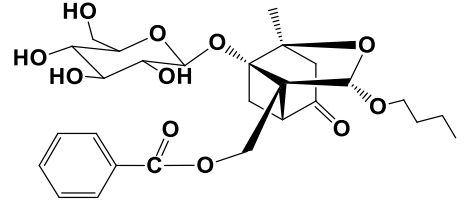
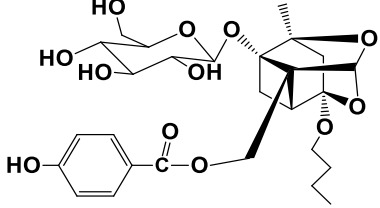
No	Structure	No	Structure
pxs-1		pxs-11	
pxs-2		pxs-12	
pxs-3		pxs-13	
pxs-4		pxs-14	
pxs-5		pxs-15	
pxs-6		pxs-16	
pxs-7		pxs-17	
pxs-8		pxs-18	
pxs-9		pxs-19	
pxs-10		pxs-20	

No	Structure	No	Structure
pxs-21		DC-2	
pxs-22		DC-3	
pxs-23		DC-4	
pxs-24		DC-5	
pxs-25		DC-6	
pxs-26		DC-7	
pxs-27		DC-8	
DC-1		DC-9	

No	Structure	No	Structure
DC-10		FJY-2	
DC-11		FJY-4	
DC-12		FJY-5	
DC-13		FJY-6	
DC-14		FJY-7	
DC-15		FJY-8	
FJY-1		FJY-9	

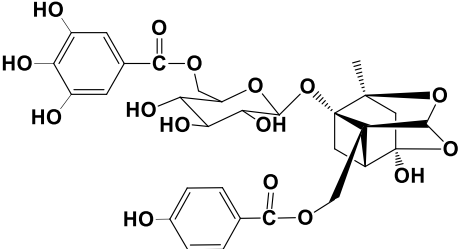
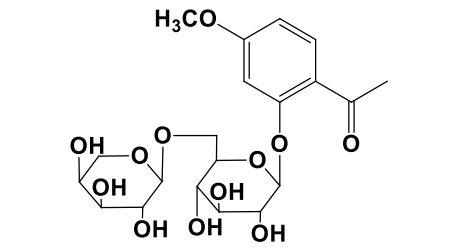
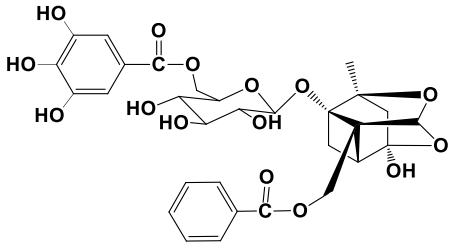
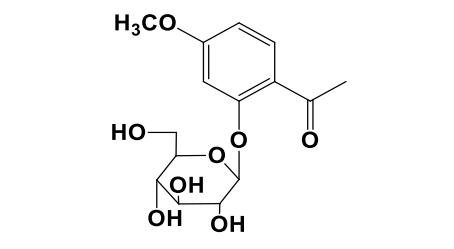
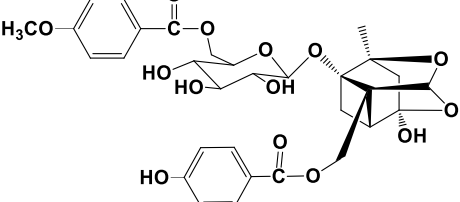
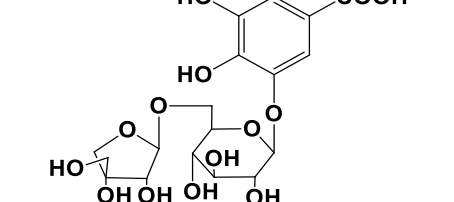
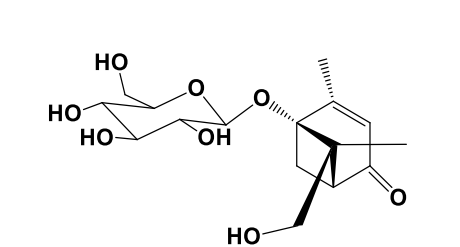
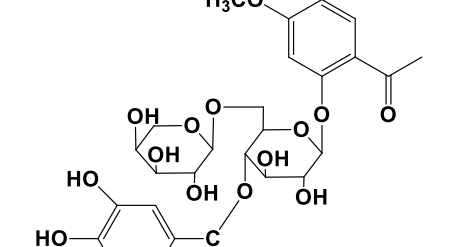
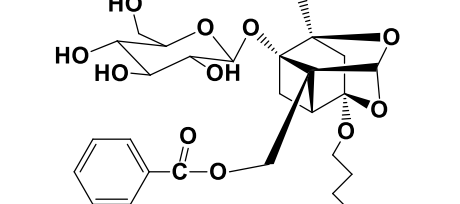
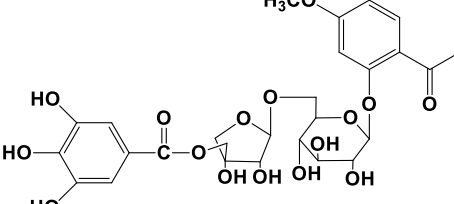
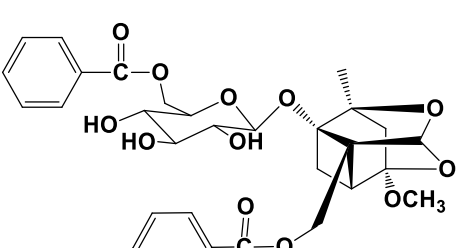
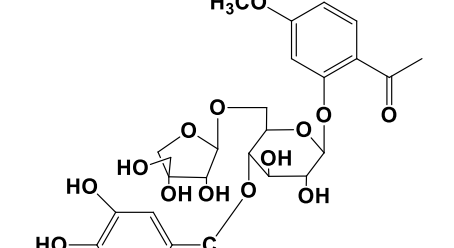
No	Structure	No	Structure
FJY-10		JSF 160106	
FJY-11		JSF 160126B	
FJY-12		JSF 160107	
FJY-13		JSF 160325A	
FJY-14		JSF 160308B	
FJY-15		JSF 130126A	

No	Structure	No	Structure
WYS-1		WYS-8	
WYS-2		WYS-9	
WYS-3		WYS-10	
WYS-4		WYS-11	
WYS-5		LCJ-No.30	
WYS-6		LCJ-No.31	
WYS-7		LCJ-No.39	

No	structure	No	structure
LCJ- No.55		mt1	
		mt2	
		mt3	
		mt4	
		mt5	
		mt6	
		mt7	

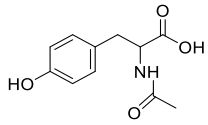
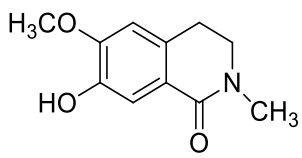
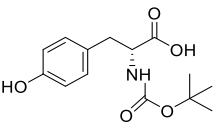
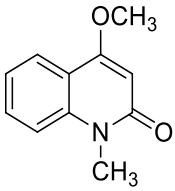
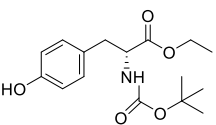
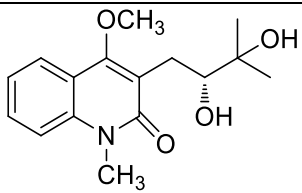
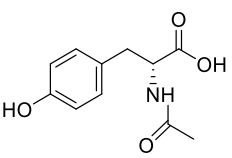
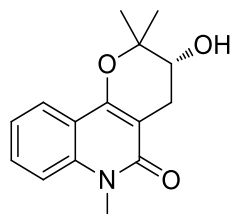
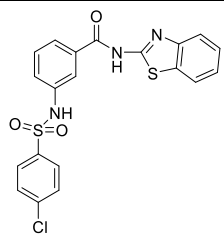
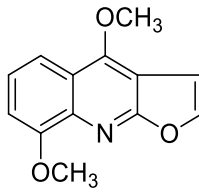
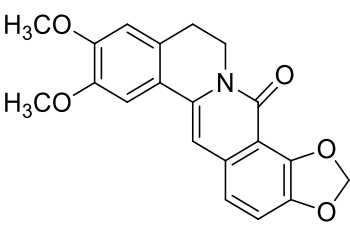
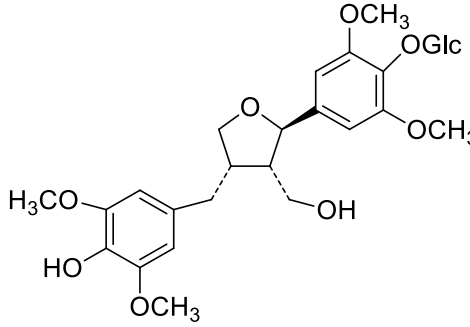
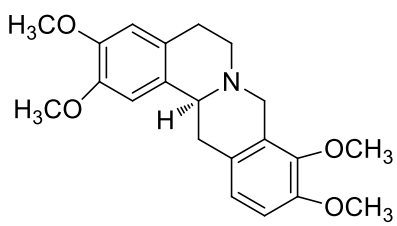
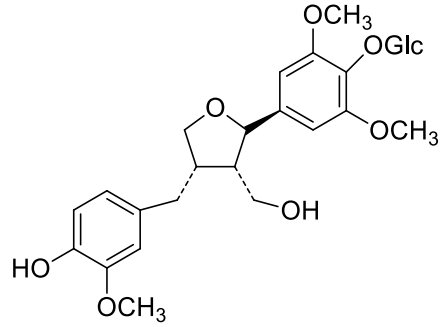
No	structure	No	structure
mt8※		mt15	
mt9※		mt16	
mt10		mt18	
mt11		mt20	
mt13		mt21	
mt14		mt22	

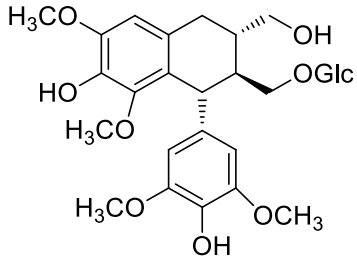
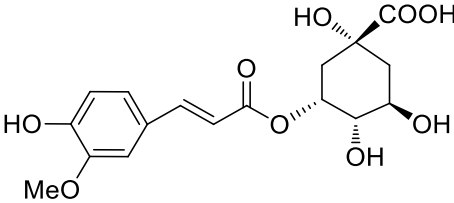
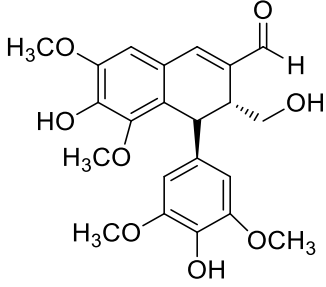
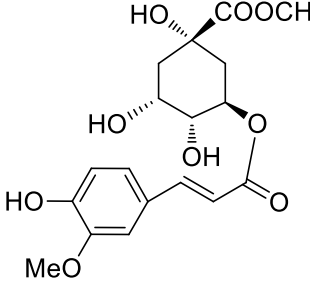
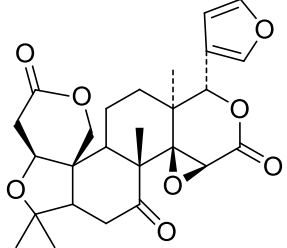
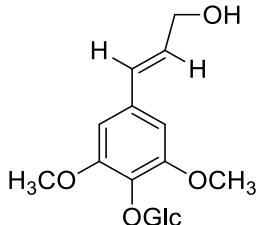
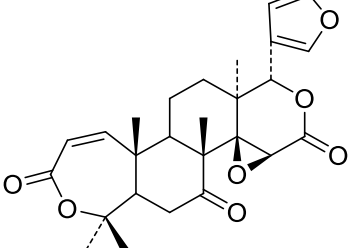
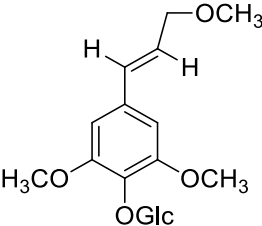
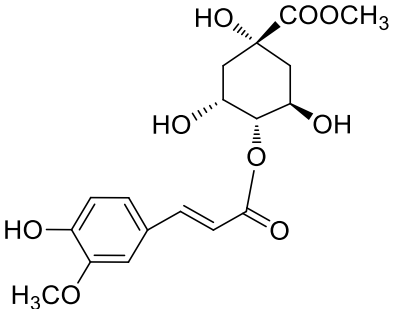
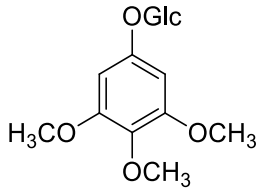
※ mjp8 および mjp9 は、混合して mjp8/9 (5 μM) として使用

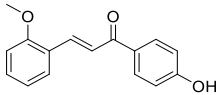
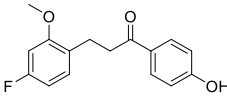
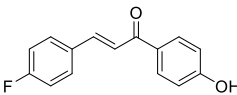
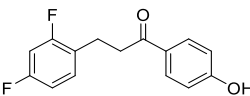
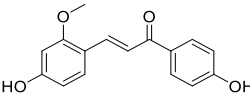
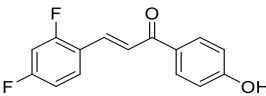
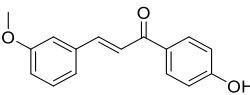
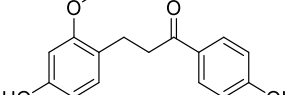
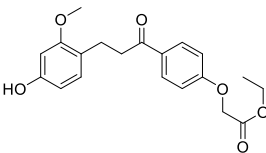
No	structure	No	structure
mt23		mt31	
mt24		mt32	
mt25		mt33	
mt26		mt34	
mt27		mt35	
mt30		mt36	

No	structure	No	structure
mt37		mt55	
mt38		mt57	
mt39		mt59	
mt40		mt60	
mt41			
mt42			

No	Structure	No	Structure
eu1		eu19	
eu3		eu23	
eu4		eu24	
eu5		eu25	
eu8		K-1	
eu9		K-2	
eu10		K-3	
eu12		K-6	

No	structure	No	structure
4-2		G-3	
4-3		G-4	
4-4		G-5	
4-5		G-6	
L-1-16		G-7	
G-1		G-8	
G-2		G-9	

No	structure	No	structure
G-10		G-15	
G-11		G-16	
G-12		G-17	
G-13		G-18	
G-14		G-19	

No	Structure
Mjp-1	
Mjp-2	
Mjp-3	
Mjp-4	
Mjp-5	
Mjp-6	
Mjp-7	
Mjp-8	
Mjp-9	

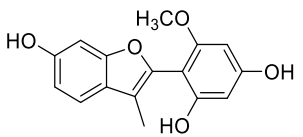
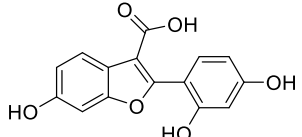
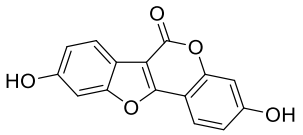
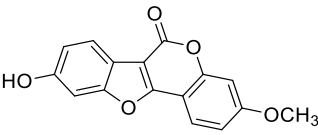
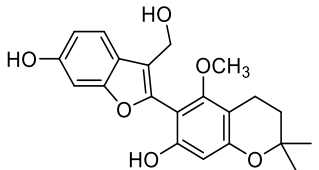
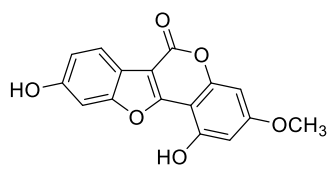
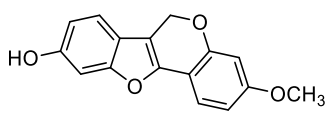
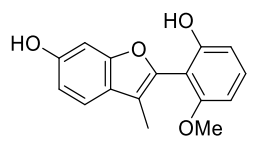
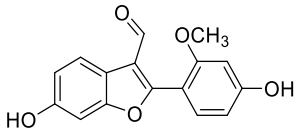
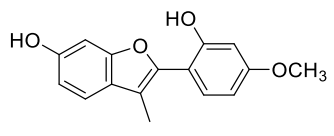
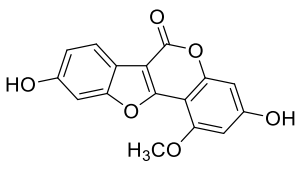
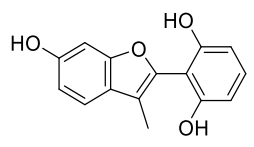
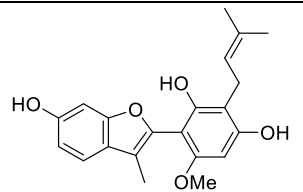
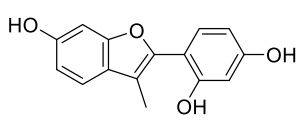
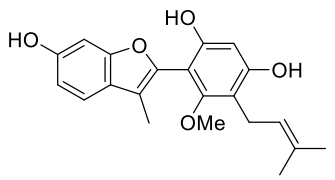
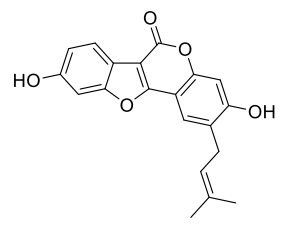
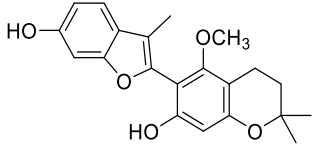
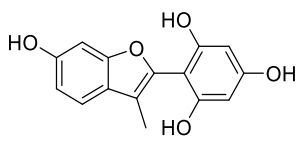
No	Structure	No	Structure
C-1		C-7	
C-2		C-8	
C-3		C-9	
C-4		C-10	
C-5		C-11	
C-6		C-12	

No	Structure	No	Structure
C-13		C-20	
C-14		C-21	
C-15		C-22	
C-16		C-23	
C-17		C-24	
C-19		C-25	

No	Structure	No	Structure
C-26		LC-1	
C-27		LC-2	
C-28		LC-3	
C-30		LC-5	
		LC-6	

No	Structure	No	Structure
LC-7		LC-13	
LC-8		LC-14	
LC-9		LC-15	
LC-10		LC-16	
LC-12		LC-17	

No	Structure	No	Structure
LC-18		LC-28	
LC-19		LC-29	
LC-22		LC-30	
LC-23		LC-31	
LC-24		LC-32	
LC-25		LC-33	
LC-26		3-1	
		3-2	

No	Structure	No	Structure
T1		T10	
T2		T11	
T3		T12	
T4		T13	
T5		T14	
T6		T15	
T7		T16	
T8		T17	
T9		T18	

No	Structure	No	Structure
T19		J-1	
T20		J-2	
T21		J-3	
T22		J-5	
T23		J-6	
		ZXY1	
		ZXY2	

1-2: 方法

1-2-2. 化合物の合成手順と分光データ

2-(2-Acetyl-5-(benzyloxy)phenoxy)acetic acid ethyl ester (2)

乾燥アセトニトリル (500 mL) 中の 2,4-dihydroxyacetophenone **1** (100.0 g, 0.657 mol) 溶液に、無水炭酸カリウム (100.0 g, 0.723 mol) を加え、混合物を 1 時間還流した。乾燥アセトニトリル (50 mL) に溶解した臭化ベンジル (76.6 mL, 0.644 mol) を混合物に滴下し、反応物を 3 時間還流した。反応混合物をシリカゲルで濾過した後、酢酸エチルで洗浄して濾液を蒸発乾固させた。粗生成物、無水炭酸カリウム (90 g, 0.657 mol)、およびクロロ酢酸エチル (96.5 g, 0.788 mol) を乾燥アセトン (400 mL) に溶解し、48 時間還流した。沈殿物をシリカゲルで濾別してアセトンで洗浄し、濾液を蒸発乾固した後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:20) で精製して、生成物 **2** (129.3 g) を白色固体として 60% の収率で得た。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.66 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H)、7.45 (m, 2H)、7.41 (m, 2H)、7.4.0 (m, 1H)、6.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)、6.72 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H)、5.18 (s, 2H)、4.95 (s, 2H)、4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H)、2.57 (s, 3H)、1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)。

(6-(Benzyloxy)benzofuran-3-yl)methanol (3)

炭酸カリウム (50 g, 0.36 mol) を激しく攪拌させた水溶液 (400 mL) に、2-(2-acetyl-5-(benzyloxy)phenoxy)acetic acid ethyl ester **2** (100 g, 0.3 mol) を加え、混合物を 3 時間穏やかに還流した。溶液を 5°C に冷却し、濃塩酸溶液で酸性化した。沈着した沈殿物を濾別し、冷水で洗浄した。得られた粗生成物を無水酢酸ナトリウム (96 g, 1.2 mol) と共に無水酢酸 (390 g, 2.8 mol) に溶解し、混合物を 160°C で 3 時間加熱した。冷却後、混合物を水 (900 mL) で希釈し、次にジエチルエーテルで抽出した。合わせた有機層を Na₂CO₃ および塩水の飽和水溶液で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、次いで蒸発乾固させた。乾燥 1,4-ジオキサン (200 mL) 中の乾燥粗生成物と二酸化セレン (33 g, 0.3 mol) の混合物を 48 時間還流した。得られた黒色の沈殿物を濾別し、粗生成物を蒸発乾固させた。粗混合物のメタノール溶液 (100 mL) に、攪拌させながらアルデヒドの全量に変換されるまで、室温で少量の NaBH₄ を加えた。次に、反応混合物を 5 M 塩酸 (10 mL) で処理した。粗生成物を酢酸エチルと水の混合物 (1 : 1, v/v) で処理した。有機層を分離後、水で洗浄して塩水に漬け、次に無水 Na₂SO₄ で乾燥して蒸発乾固した後、シリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:5, R_f = 0.1) で精製し、63% の収率で黄色の粉末の生成物 **3** (48.0 g) を得た。Mp 126.6–127.1 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.55 – 7.51 (m, 2H)、7.46 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H)、7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H)、7.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H)、7.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H)、6.99 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H)、5.11 (s, 2H)、4.80 (s, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 157.5, 156.7, 141.6, 137.0, 128.8, 128.2, 127.6,

120.5、120.4、120.2、112.7、97.6、70.7、56.2; IR (thin film, cm^{-1}) 3402、3052、2928、2843、1597、1483、1120; HRMS (ESI-TOF) m/z $[M+H]^+$ Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_3$ 255.1021; Found 255.1016.

6-(Benzyloxy)-3-((3,5-bis(benzyloxy)phenoxy)methyl)benzofuran (5)

(6-(benzyloxy)benzofuran-3-yl)methanol **3** (2.0 g, 8 mmol)、3,5-dibenzyloxy phenol **4** (2.9 g, 9.6 mM) およびトリフェニルホスフィン (3.2 g, 12 mmol) の溶液に乾燥 THF にジイソプロピルアゾジホルメート (2.4g, 12 mmol) を 0°C で 15 分間、窒素大気下で滴下し、反応物を室温で 4 時間攪拌した。粗混合物を蒸発乾固し、シリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:50, R_f = 0.3) により精製して、45%の収率で黄色の油層として生成物 **5** (1.9 g) を得た。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (s, 1H)、7.50 (d, J = 8.5 Hz, 1H)、7.46 (d, J = 7.4 Hz, 2H)、7.37-7.43 (m, 4H)、7.39 (t, J = 7.5 Hz, 6H)、7.32-7.35 (m, 3H)、7.09 (d, J = 2.2 Hz, 1H)、6.99 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H)、6.29 (s, 3H)、5.12 (s, 2H)、5.10 (s, 2H)、5.01 (s, 4H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 160.8、160.6、157.6、156.6、142.5、137.0、136.9、128.8、128.7、128.6、128.2、128.1、127.7、127.6、127.4、120.5、120.3、116.7、112.9、97.6、95.2、95.0、70.7、70.3、61.5; IR (thin film, cm^{-1}) 3430、3031、2873、1624、1599、1454、1378、1164、1134、1058; HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ Calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{O}_5$ 543.2166、Found 543.2174.

3,5-Bis(benzyloxy)-2-(6-(benzyloxy)-3-methylbenzofuran-2-yl)phenol (6)

6-(benzyloxy)-3-((3,5-bis(benzyloxy)phenoxy)methyl)benzofuran **5** (1.0 g, 1.8 mmol) の DCM 溶液 (10 mL) に、シリカゲルを加え (2.0 g)、DCM を真空下で除去し、混合物を 140°C で 4 時間加熱した。粗混合物をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:10, R_f = 0.2) で精製して、73%の収率で黄色の油層油として生成物 **6** (713 mg) を得た。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.47 (dd, J = 7.9, 0.9 Hz, 2H)、7.44 – 7.42 (m, 2H)、7.41 – 7.38 (m, 5H)、7.36 – 7.32 (m, 2H)、7.29 – 7.27 (m, 3H)、7.26 – 7.23 (m, 2H)、7.09 (d, J = 2.1 Hz, 1H)、6.98 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H)、6.32 (d, J = 2.3 Hz, 1H)、6.29 (d, J = 2.3 Hz, 1H)、5.95 (s, 1H)、5.13 (s, 2H)、5.05 (s, 2H)、5.03 (s, 2H)、2.10 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 161.7、158.6、157.3、156.7、155.6、143.9、137.1、136.8、136.7、128.8、128.7、128.6、128.3、128.1、127.8、127.7、127.6、127.1、124.1、119.7、115.8、112.2、100.4、97.3、94.7、94.2、70.8、70.6、70.3、9.3; IR (thin film, cm^{-1}) 3433、3032、2921、2854、1629、1452、1384、1151; HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ Calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{O}_5$ 543.2166、Found 543.2173.

6-(Benzyloxy)-2-(2,4-bis(benzyloxy)-6-methoxyphenyl)-3-methylbenzofuran (7)

NaH (パラフィン油中 60%分散液) (40 mg, 1.0 mmol) の THF 懸濁液 (4 mL) に、窒素大気下で攪拌しながら 0°C で乾燥 THF (1 mL) 中の 3,5-bis(benzyloxy)-2-(6-(benzyloxy)-3-methylbenzofuran-2-yl)phenol **6** (488 mg, 0.9 mmol) の溶液を加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、iodomethane (255

mg、1.8 mmol) を 10 分かけて滴下した。混合物を室温で一晩攪拌した。saturated aqueous solution of ammonium chloride (20 mL) を加えることにより反応混合物をクエンチし、ethyl acetate (20 mL) で抽出した。合わせた有機層を塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ 乾燥して蒸発乾固し、シリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:20, Rf = 0.3) で精製して、85%の収率で黄色の油層として生成物 **7** (473 mg) を得た。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.49 – 7.29 (m, 11H)、7.25 – 7.18 (m, 5H)、7.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H)、6.94 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H)、6.30 (dd, *J* = 12.4, 2.2 Hz, 2H)、5.12 (s, 2H)、5.06 (s, 2H)、5.02 (s, 2H)、3.75 (s, 3H)、2.07 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.6、160.4、159.4、156.7、155.6、145.2、137.4、137.1、136.7、128.8、128.7、128.5、128.0、127.8、127.7、127.6、126.9、124.4、119.3、114.4、111.4、102.7、97.4、93.6、92.4、70.8、70.7、70.4、56.1、9.0; IR (thin film, cm⁻¹) 3428、2923、2855、1630、1384、1101; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ Calcd. for C₃₇H₃₃O₅ 557.2323、Found 557.2332。

4-(6-Hydroxy-3-methylbenzofuran-2-yl)-5-methoxybenzene-1,3-diol (**8**)

6-(benzyloxy)-2-(2,4-bis(benzyloxy)-6-methoxyphenyl)-3-methyl-benzofuran **7** (390 mg、0.7 mmol) の MeOH 溶液 (10 mL) に 10%Pd/C (40 mg) を加えた。次に、反応容器を排気し、水素に置き換えた。8 時間激しく攪拌した後、反応混合物をシリカゲルで濾過して濾液を蒸発乾固し、シリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:2, Rf = 0.1) によって精製して、85%の収率で無色の油層として生成物 **8** (170 mg) を得た。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H)、6.80 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H)、6.70 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H)、6.04 (dd, *J* = 6.7, 2.1 Hz, 2H)、3.68 (s, 3H)、2.00 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.5、159.9、157.8、155.6、154.5、145.1、123.2、118.4、113.4、110.3、98.9、97.0、95.0、90.7、54.6、7.4; IR (thin film, cm⁻¹) 3450、2967、2788、1695、1314; HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ Calcd. for C₁₆H₁₆O₅ 287.0914、Found 287.0910。

2-(2-Methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran (**9**)

NaH (パラフィン油中 60%分散液) (40 mg、1.0 mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド懸濁液 (5 mL) に、乾燥ジメチルホルムアミド (2 mL) 中の 4-(6-hydroxy-3-methylbenzo furan-2-yl)-5-methoxybenzene-1,3-diol **8** (286 mg、1.0 mmol) の溶液を窒素大気下で攪拌しながら 0°C で加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、クロロメチルメチルエーテル (161 mg、2.0 mmol) を 0°C で 30 分以上滴下した。反応物を室温で 6 時間攪拌し、NH₄Cl の飽和水溶液 (20 mL) でクエンチし、酢酸エチル (20 mL) で抽出した。合わせた有機層を塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ 乾燥させ、蒸発乾固させた。粗物質をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:10, Rf = 0.1) により精製して、83%の収率で無色の油層として生成物 **9** (347 mg) を得た。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.44 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H)、7.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H)、6.95 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H)、6.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H)、

6.47 (d, $J=2.1$ Hz, 1H)、5.26 (s, 2H)、5.22 (s, 2H)、5.11 (s, 2H)、3.70 (s, 3H)、3.43 (s, 3H)、3.40 (s, 3H)、3.25 (s, 3H)、1.98 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 159.8、159.7、157.3、154.5、154.4、145.2、124.4、119.2、113.4、112.3、102.4、98.9、95.6、94.5、94.2、94.0、93.8、55.9、55.8、55.6、55.5、8.4; IR (thin film, cm^{-1}) 3422、2922、285、1804、1697、1492、1454、1153、1025; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_8$ 419.1700、Found 419.1709。

2-(3-Bromo-2-methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran (10)

2-(2-methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran **9** (418 mg、1.0 mmol) の DCM 溶液 (10 mL) に、N-bromosuccinimide (178 mg、1.0 mmol) DCM (5 mL) 溶液を加え、 0°C の窒素大気下で攪拌しながら滴下し、混合物を室温で 1 時間攪拌した後、反応混合物を蒸発乾固させた。粗物質をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:10, $R_f = 0.1$) により精製して、35%の収率で無色の油層として生成物 **10** (174 g) を得た。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)、7.20 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H)、7.00 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H)、6.90 (s, 1H)、5.30 (s, 2H)、5.22 (s, 2H)、5.09 (s, 2H)、3.58 (s, 3H)、3.56 (s, 3H)、3.52 (s, 3H)、3.38 (s, 3H)、2.12 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 158.2、156.9、156.3、155.4、155.3、144.5、124.9、119.5、115.0、112.6、110.2、101.1、99.6、99.5、95.3、95.2、61.5、56.8、56.4、56.1、8.8; IR (thin film, cm^{-1}) 3422、2922、2253、2126、1652、1384、1051、1026、1005; HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{Br}$ 497.0811、Found 497.0815。

2-(2-Methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran (12)

2-(3-bromo-2-methoxy-4,6-bis(methoxy methoxy)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran **10** (99 mg、0.2 mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド溶液 (5 mL) に、cesium carbonate (130 mg、0.4 mmol)、[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (7 mg、0.01 mmol)、および 4,4,5,5-tetramethyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-1,3,2-dioxaborolane **11** (58 mg、0.3 mmol) を窒素雰囲気下で加え、混合物を 90°C で 9 時間攪拌した。出発物質が完全に消費されるまで、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって反応をモニターした。反応混合物を ethyl acetate (10 mL) で希釈し、水 (15 mL) で洗浄した。有機層を塩水で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発乾固させた。粗物質をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:10, $R_f = 0.1$) により精製して、78%の収率で無色の油として生成物 **12** (76 mg) を得た。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)、7.21 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H)、6.97 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H)、6.61 (s, 1H)、5.25 (s, 2H)、5.24 – 5.22 (m, 1H)、5.21 (s, 2H)、4.64 (s, 2H)、3.75 (s, 3H)、3.51 (s, 6H)、3.40 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H)、3.16 (s, 3H)、2.09 (s, 3H)、1.78 (s, 3H)、1.68 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 158.1、157.9、156.3、155.4、155.1、146.1、131.1、

125.2、123.6、119.3、117.0、114.5、112.4、107.3、99.8、99.7、95.4、94.8、94.5、57.3、56.21、56.17、56.1、25.9、23.3、18.0、8.8; IR (thin film, cm^{-1}) 3425、2921、2827、1589、1469、1381、1152、1105; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{O}_8$ 487.2326、Found 487.2335。

6-(6-Hydroxy-3-methylbenzofuran-2-yl)-5-methoxy-2,2-dimethylchroman-7-ol (T9)

2-(2-methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)-6-(methoxymethoxy)-3-methylbenzofuran **12** (71 mg, 0.2 mmol) の MeOH 溶液 (5 mL) に、CSA (23 mg, 0.1 mmol) を加え、得られた混合物を 50°C で 12 時間攪拌した。出発物質が完全に消費されるまで、反応を TLC でモニターした。Na₂CO₃ の飽和水溶液 (10 mL) を加えることにより反応混合物をクエンチし、ethyl acetate (10 mL) で抽出した。有機層を塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、蒸発乾固させた。粗物質をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ethyl acetate/petroleum ether = 1:2, R_f = 0.2) により精製して、75% の収率で無色の油として生成物 **T9** (39 mg) を得た。

1-2-5. ドッキングシミュレーション

低分子化合物と受容体タンパク質の結合様式を推定するために、AutoDock 4 [1] を利用して、ドッキングシミュレーションを実施した。ドッキング計算には、ヒトエストロゲン受容体 (PDB ID: 1X7E [2]) の結晶構造を用いた。グリッドボックスは 0.375Å のグリッド間隔で作成され、その中心は共結晶リガンドの配位で定義された。T9 の構造は、SYBYL 6.9.1 ソフトウェア (Tripos Inc.) で構築および最適化された。Lamarckian 遺伝的アルゴリズムにより、最適なドッキングサーチパラメーターが設定された (エネルギー評価の最大回数/実行: 25 000 000、Solis & Wets search の反復: 3000、個体数: 300、世代数: 100)。根平均自乗変位 (Root Mean Squared Displacement: RMSD) が 2Å 未満で計算された結合構造は、1 つのクラスターに分割され、結合エネルギーが最も低く、頻度の割合が最も高いコンフォメーションを代表的な結果として選択された。その他のパラメーターはデフォルトのまま用いられた。

1-3: 結果

1-3-3 T9 の化学合成

クロマン誘導体 **T9** は、重要なステップとなる cascade [3,3]-sigmatropic rearrangement/aromatization strategy の手順に従って合成された[3]。エーテル前駆体 **5** は、benzofuran-3-ylmethanol **3** と phenol **4** から Mitsunobu 反応により調製し、化合物 **1** から既知の方法で合成した。合成した基質 **5** をシリカゲルと混合し、4 時間、140°C で加熱した結果、73% の収率で生成物 **2** が得られた。O-メチル化、水素化、ヒドロキシル基の MOM 保護および臭素化を含むいくつかの官能基変換の後、中間体 **10** が中程度の収率で得られた。最後に、クロマン誘導体 **T9** は、臭化物前駆体 **10** と prenyl boronic ester **11** の間の palladium-catalyzed Suzuki coupling と、CSA 促進カスケード MOM 脱保護および環化反応によって生成された。

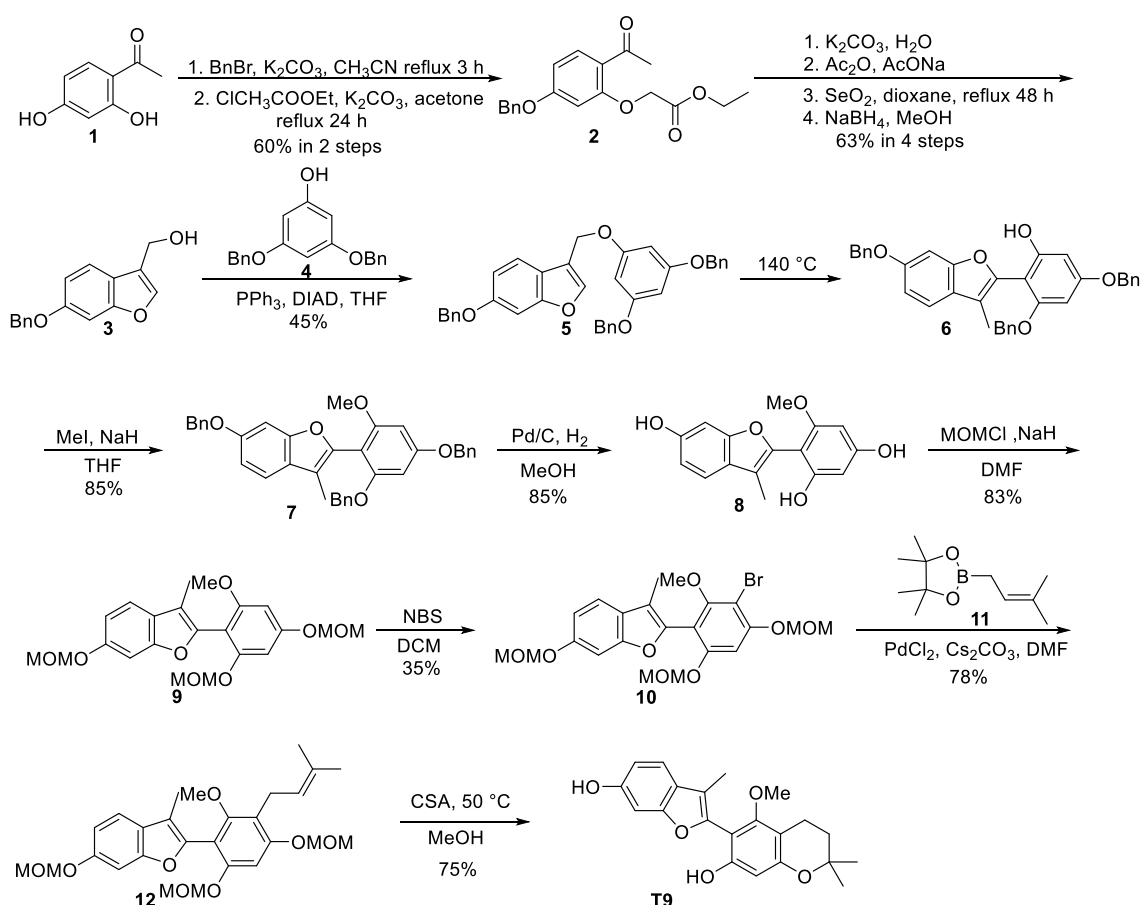


Fig. 1S. クロマン誘導体 T9 の合成経路

参考文献

- [1] G.M. Morris, H. Ruth, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [2] B. Sezen, D. Sames, Erratum: Oxidative C-arylation of free (NH)-heterocycles via direct (sp³) C-H bond functionalization (*Journal of the American Chemical Society* (2004) 126 (13244-13246)), *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3102. <https://doi.org/10.1021/ja069957d>.
- [3] Y. Tang, C. Jiang, X. Zhang, C. Liu, J. Lin, Y. Wang, C. Du, X. Peng, W. Li, Y. Liu, M. Cheng, Collective Syntheses of 2-(3-Methylbenzofuran-2-yl)phenol-Derived Natural Products by a Cascade [3,3]-Sigmatropic Rearrangement/Aromatization Strategy, *J. Org. Chem.* 82 (2017) 11102–11109. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02066>.

